Zur Wirkung von Ultraschall auf Epidermiszellen
Eine elektronenmikroskopische Untersuchung

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Ingrid Dehner
aus Würzburg

Bonn 1980

Zur Wirkung von Ultraschall auf Epidermiszellen
Eine elektronenmikroskopische Untersuchung

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Ingrid Dehner
aus Würzburg

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Klingmüller
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Gullotta

Aus der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten
Direktor: Prof. Dr. H.W. Kreysel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0023

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	7
B. DER ULTRASCHALL IN DER MEDIZIN	8
I. Historische Entwicklung	8
II. Ultraschallwirkungsmechanismen	9
1. Physikalische Grundlagen	9
2. Biologische Wirkungen	11
III. Schädigung durch Ultraschall	13
1. Wirkung auf Chromosomen	13
2. Wirkung auf die Zelle, Zellorganellen und Enzymsysteme	14
3. Wirkungen auf die Haut	16
C. SCHÄDIGUNG DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS - ULTRAMIKROSKOPISCHE BETRACHTUNGEN	18
I. Chemische Agenzien	18
1. Kantharidin	18
2. Kerosin und Aceton	19
3. NaOH und HCl	21
4. Autolyse	22
II. Physikalische Einflüsse	23
1. Sog	23
2. Spannung	24
3. Abziehen der Hornschicht	25
4. Verbrennung	26
5. Kälte	28
6. Ultrazentrifugation	28
7. UV-Bestrahlung	29
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	30
I. Material	30

II. Ultraschallbeschallung 30

1. Gerät 30
2. Versuchsanordnung 30
3. Versuchsdurchführung 30

III. Elektronenmikroskopie 32

1. Präparationsmethodik 32
2. Durchführung 33

IV. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Epidermis unter verschiedenen Beschallungsstufen 33

1. Keratinozyt und Nichtkeratinozyt im normalen Zellverband 33
2. Morphologische Veränderungen des Keratinozyten durch Ultraschall 33

a) bei einer Intensität von 1 W/cm^2 34
b) bei einer Intensität von 2 W/cm^2 34
c) bei einer Intensität von 3 W/cm^2 37

3. Morphologische Veränderungen des Nichtkeratinozyten durch Ultraschall 41

E. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 43

F. ZUSAMMENFASSUNG 50

G. BILDTEIL 52

H. LITERATURVERZEICHNIS 73

A. EINLEITUNG

Der Ultraschall erlangte in den letzten Jahren sowohl in Therapie wie insbesondere in der Diagnostik eine immense Bedeutung und ist im Begriff, lang bewährte Diagnostikverfahren zu bereichern, und sich sogar anderen Verfahren, deren schädigende Wirkung auf den menschlichen Organismus bekannt ist, als mögliche Alternative anzubieten.

Diese Entwicklungen, besonders aber eine Publikation über "Schädigung von Körpergewebe durch Ultraschall" von R. WITTENZELLNER (1977), eine histologische Untersuchung von beschallter Haut (in vivo) 25 Jahre danach, haben uns veranlaßt, die Ultraschall-Wirkung verschiedener Intensitäten und unterschiedlicher Beschallungsdauer auf Epidermiszellen gesunder Haut in vitro elektronenmikroskopisch zu untersuchen.

B. DER ULTRASCHALL IN DER MEDIZIN

I. Historische Entwicklung

Von der ersten Kenntnisnahme des "Ultraschalls" bis zu seinem heutigen, hochdifferenzierten Einsatz in der Medizin sind fast zweihundert Jahre vergangen. Noch am Ende des 18. Jahrhunderts bemerkte SPALLANZANI 1793 bei Fledermäusen, wie sie sich nach seiner Meinung wohl durch Aussendung und Empfang von für menschliche Ohren nicht wahrnehmbaren Tönen mühelos zwischen Hindernissen im Raum fortbewegten. Dies wurde dann erst 1920 von HARTRIDGE bestätigt.
Bereits im ersten Weltkrieg (1914 - 1918) kam Ultraschall als Echolot im militärischen Bereich zur Ortung von Unterseebooten zum Einsatz. Bei der Verwendung der dafür nötigen, hohen Ultraschallenergie beobachtete LANGUEVIN 1917, wie Fische gelähmt oder gar getötet wurden, wenn sie in den Ultraschallstrahl kamen.
Desweiteren entdeckte man den Ultraschall als gute Möglichkeit für Werkstoffprüfungen, ohne dabei den Werkstoff selbst zu zerstören.
In der Medizin fand der Ultraschall Eingang mit der erfolgreichen Therapie von Ischiasbeschwerden und Plexusneuralgien durch POHLMANN, RICHTER und PAROW, 1939, die damit einen Grundstein zu einer weiten Palette für Therapiealternativen von chronischen Schmerzzuständen und rheumatischen Erkrankungen schafften.
Mit dem Versuch von HORVARTH 1944 (zitiert nach KOEPPEN, 1954), Hautsarkome und Hautkarzinome mit Ultraschall zu behandeln, war auch der Ansatz für eine Tumortherapie gegeben, der in dieser Zeit von vielen Autoren aufgenommen wurde.
In heutiger Zeit sind Ultraschall-Doppler-Sonographie, A-Scan und B-Scan bewährte Verfahren zur Diagnostik in vielen Fächern der Medizin, wie Innere Medizin, Angiologie, Kardiologie, Neurologie, Gynäkologie, Geburtshilfe, Urologie, Nephrologie, Pädiatrie, Chirurgie und Ophthalmologie (EHLER, LUTZ, PETZOLDT, 1977).

II. Wirkungsmechanismen des Ultraschalls

1. Physikalische Grundlagen

Zu den physikalischen Grundlagen möchte ich auf das Buch von L. BERGMANN 'Der Ultraschall und seine Anwendung in Wissenschaft und Technik' verweisen. In meiner Arbeit möchte ich mich auf die allgemeinen Grundlagen beschränken, soweit sie zum Verständnis der Untersuchungen nötig sind.

Als U l t r a s c h a l l (US) werden mechanische Wellen von einer Frequenz zwischen 16000 und 10^9 Hz bezeichnet. Sie liegen damit außerhalb des menschlichen Hörbereichs. Wegen der hohen Schwingungsfrequenzen - in der medizinischen Diagnostik werden Frequenzen von 1 - 10 MHz verwendet - und der geringen Wellenlänge - so beträgt die Wellenlänge bei einer Frequenz von 800 kHz 1,87 mm im menschlichen Gewebe (KNOCH, KNAUTH, 1977) - kann der US gut gebündelt werden. Er zeigt demnach Strahlencharakter und verhält sich bei Brechung und Reflexion nach den Gesetzen der Optik.

1880 fanden die Gebrüder J. und P. CURIE, daß polar gebaute Kristalle (z.B. der Quarz) im elektrischen Wechselfeld mechanische Wellen aussenden, den "piezoelektrischen Effekt". Dieser Vorgang ist umkehrbar, so daß jeder "Aussender" von US auch gleichzeitig ein "Empfänger" von US sein kann. Als US-Erzeuger benützt man heute meist Bariumtitanat.

Im menschlichen Körper breitet sich der US als L o n g i t u d i n a l w e l l e mit einer ungefähren Fortpflanzungsgeschwindigkeit von 1500 m/s aus (KNOCH, KNAUTH, 1977; KRESSE, 1973). Diese hohe Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Ultraschallwelle lenkt alle Teilchen in ihre Ausbreitungsrichtung ab. Jedes Teilchen eines beschallten Mediums verbleibt im Mittelpunkt seines Ruheortes. Ein Energietransport findet durch Druckausgleich statt. Bei jeder Schwingung entstehen Druckschwankungen, einerseits Überdruck, zum anderen Unterdruck. Er beträgt im

menschlichen Gewebe bei 800 kHz und 2 W/cm^2 8,4 at/mm, was für jede einzelne Zelle ca. 0,17 at bedeutet. Je höher daher die Frequenz, desto schneller wechselt auch das Druckgefälle. Die Teilchenauslenkungen, d.h. Verschiebungen in einer Zelle machen ebenfalls bei 800 kHz und 2 W/cm^2 nur 1 °/oo ihres Durchmessers aus (KNOCH, KNAUTH, 1977).
Die oben genannte Fortpflanzungsgeschwindigkeit ist in Fett, Muskel, Gehirn und Wasser annähernd gleich, während Knochen und Luft wesentlich höhere Werte zeigen.

Von der Wellenlänge ist die A b s o r p t i o n im menschlichen Gewebe abhängig. Je höher die Frequenz, desto größer ist auch die Absorption und desto geringer die Eindringtiefe des Ultraschalles. So ist der A b s o r p t i o n s k o e f f i z i e n t für Fett kleiner als für Muskulatur (POHLMANN et al., 1939). Eine R e f l e x i o n findet nur an Knochen und gashaltigen Organen statt.

In der Medizin wird Ultraschall als I m p u l s s c h a l l und als D a u e r s c h a l l angewendet. Beim Gleichschall wird die nicht unterbrochene Longitudinalwelle permanent in einer Frequenz, bei Therapiegeräten 800 kHz, abgegeben. Die eingestrahlte Energie wirkt also ohne Unterbrechung auf das Gewebe und führt so zu hoher Beanspruchung. Der Nachteil dieser Schallform liegt in der großen Wärmeentwicklung, die beim Impulsschall nicht auftritt. In der Ultraschalltherapie bewegt man deshalb den Schallkopf unter dauernder Bewegung über das zu beschallende Gebiet.
Impulsschall heißt regelmäßig unterbrochener Gleichschall; üblich sind Impulsdauern von 1 - 100 /us. Hier kann man die Frequenzen erhöhen, ohne die Intensitäten und deren Nachteile vergrößern zu müssen, was in der Diagnostik bevorzugt wird (siehe Tabelle, von KRESSE, 1973, übernommen).
LEINWEBER et al., 1979, rechnen ab einer Schallintensität von 3 W/cm^2 mit einer Gewebsschädigung durch Energieumwandlung, KNOCH et al., 1977, ab einer Intensität von 2 W/cm^2.

Tabelle 1 (KRESSE 1973, S. 290): Medizinischer Ultraschall

	Therapie	Diagnostik	
Frequenz	800 kHz	1 - 10 MHz	
Art	Dauerschall	Dauerschall	Impulsschall
mittl. Intens.		30 mW/cm^2	10 mW/cm^2
max. Intens.	3 W/cm^2		10 W/cm^2
Tastverhältnis = Impulsdauer/Impulsperiodendauer			1 : 1000

2. Biologische Wirkungen

Bei der Beschreibung der biologischen Wirkungen des US möchte ich ebenfalls bei den allgemeinen Wirkungen bleiben und ansonsten auf den ausführlichen Kongreßbericht der Erlanger Ultraschalltagung 1949 'Der Ultraschall in der Medizin', S. Hirzel Verlag Zürich, 1949, hinweisen.

Die Wirkung des Ultraschalles auf den menschlichen Körper ist weitgehend von seinen Parametern Intensität, Frequenz, Beschallungszeit, Schallfeld und Gewebeart geprägt. Eine wesentliche Bedeutung kommt jedoch der Intensität zu. KNOCH et al., 1977, unterteilen die biologischen Wirkungen noch in m e c h a n i s c h e, t h e r m i s c h e und p h y s i k o c h e m i s c h e.

a) Mechanische Wirkung:

Die Ultraschallwellen verursachen Druckgefälle in den Zellen, woraus eine Druck- und Zugwirkung auf die einzelnen Zellelemente resultiert. Eine positive Reizwirkung könne man bis zu einer Intensität von 1 W/cm^2 bemerken, die sich

in einer besseren Sauerstoffversorgung für den Zellstoffwechsel zeige, eine Intensität ab 2 W/cm^2 und mehr würde dann eher in Richtung Gewebszerstörung wirken.

b) Thermische Wirkung:

Als besonderen "Nebeneffekt" des Ultraschalles muß man die thermische Wirkung bezeichnen. Durch das Hin- und Herbewegen der Teilchen entsteht innere Reibung und dadurch wird mechanische Energie in Wärmeenergie umgewandelt und freigesetzt. Diese Wärmeentstehung spielt bei Dosierungen von 2 - 5 W/cm^2 eine große Rolle, der Hauptbereich in der Ultraschalltherapie.
KNOCH et al., 1977, fanden bei einem in vivo-Versuch eine Temperaturabnahme des beschallten Gebietes um 2 - 4 ^{o} C; in der Umgebung des beschallten Areales dagegen eine Temperaturerhöhung von 0 - 0,4 ^{o} C in der Haut, 1,4 - 4 ^{o} C im Knochen. Nach KIHN (siehe KNOCH et al., 1977) komme es bei therapeutischen Dosen bis 1 W/cm^2 zu keinem Temperaturanstieg der beschallten Haut, es resultiere aber eine beschleunigte Sauerstoffdiffusion ohne Temperatursteigerung. Der Ultraschallreiz bewirke in therapeutischen Größen eine Auflockerung der Zellmembran, wie auch MENDEZ et al., 1976, in ihrem Versuch mittels D_2O eine Steigerung der Durchlässigkeit zelluloser Membranen für Wasser nachweisen konnten. So kann man gesteigerte Stoffwechselvorgänge ohne vermehrte Hautdurchblutung annehmen.

c) Physiko-chemische Wirkungsweise:

Hier muß man als Phänomen die K a v i t a t i o n erwähnen: Durch die Druck- und Zugwirkungen der Ultraschallwellen können momentan gashaltige Blasen entstehen, erweitert oder gar aufgerissen werden. Die Kavitation ist frequenzunabhängig und kann ab 1 W/cm^2 entstehen. Nach GRIFFIN, 1966, entsteht im menschlichen Gewebe bei Intensitäten, die kleiner als 3 W/cm^2 sind, keine Kavitation, obwohl in intra- und extrazellulären Flüssigkeiten bekanntermaßen viele Gase gelöst seien. Die Entstehung der Kavi-

tation bei einem flüssigen Medium hängt von seiner Dichte und Viskosität ab. Die Kavitation kann irreversible Schäden hinterlassen.
Bewiesene (KNOCH et al., 1977) Reaktionsabläufe durch US sind: Steigerung der Diffusionsfähigkeit von Membranen (MENDEZ et al., 1976), Umwandlung von Gel- in Solzustand, die Leitfähigkeit von elektrolytischen Lösungen wird erhöht, Oxydationsvorgänge laufen schneller ab, der pH bewegt sich auf das alkalische Milieu zu und eine Katalysator-ähnliche Wirkung.

III. Schädigung durch Ultraschall

1. Wirkung auf Chromosomen

Obwohl die Bestimmung von intrauteriner Reife, groben Mißbildungen von Feten, Placentalage u.a. mittels diagnostischen Ultraschalles bei schwangeren Frauen schon über viele Jahre hinweg als Routineverfahren praktiziert wird, gibt es noch immer unterschiedliche Meinungen zur möglichen Schädigung des Ultraschalls (bei diagnostischer Intensität) für den wachsenden Feten. Es wurden verschiedene Untersuchungen über Chromosomenschädigungen angestellt, die aber teilweise wegen der nicht zu vergleichenden Versuchsansätze keine eindeutigen Schlüsse ziehen lassen.

FISCHER et al., 1967, beschallten Lymphozyten von Neugeborenen mit 3 W/cm^2, 810 kHz, 10 min lang und fanden in angelegten Kulturen k e i n e Änderung der Mitoserate und keine Vermehrung der Chromosomenabbrüche gegenüber Kontrollen.

CLARKE et al., 1969, stellten bei einer Leukämiezellenkultur (Impulsschall, zwischen 5 - 15 W/cm^2, 1 MHz, 10 sec Beschalldauer) über die Hälfte w e n i g e r Mitosen als bei unbe-

schallten Kulturen fest.

D i e e m p f i n d l i c h s t e n P h a s e n i m Z e l l z y k l u s s e i e n d i e d e r D N A - S y n t h e s e u n d d e r M i t o s e , w o d i e C h r o m o s o m e n s i c h t b a r w ü r d e n .

HELLMANN et al., 1970, versuchten statistisch signifikante fetale Abnormalitäten bei einer ausgewählten Gruppe von in der Schwangerschaft beschallten Frauen zu erkennen. Die gefundene Rate von 2,7 % ergab gegenüber den fetalen Abnormitäten aller Frauen in den USA mit 4,8 % keine Erhöhung - unabhängig von der Beschallungshäufigkeit und unabhängig vom Schwangerschaftszeitpunkt, an dem Ultraschalluntersuchungen stattgefunden hatten.

MACINTOSH und DAVEY (1972) beschrieben bei der Beschallung menschlicher Leukozyten, 2 MHz, 1 h, anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve Chromosomenschäden erst ab 8,2 mW/cm^2, jedoch keine signifikanten Schädigungraten.
Dem entsprachen Untersuchungen von WATTS et al., 1972, über die Beschallung peripheren, menschlichen Blutes in vitro mit Gleich- und Impulsschall (Frequenz 1 - 2,5 MHz, Intensität bis zu 8 W/cm^2) in einer Beschallungszeit bis zu 20 h, die k e i n e Chromosomenschäden ergaben.

Weitere Untersuchungen von Zellkulturen: HILL et al., 1972, chinesische Hamsterzellen (1 MHz, 150 W/cm^2, 1 - 2 h); ROTT et al., 1972, menschliche Lymphozyten mit Dauerschall (870 kHz, 4 W/cm^2, 1 h); LYON et SIMPSON, 1974, Mäusegonaden, 1,5 MHz, 1,6 W/cm^2, 15 min; LOCH, 1973, Embryonalzellen und Kaninchenovarien mit 1 mW/cm^2, 2 MHz, o h n e Nachweis einer signifikanten Chromosomenaberrationsrate.

2. Wirkungen auf Zelle, Zellorganellen und Enzymsysteme

Für die zellinaktivierende, bzw. zellschädigende Wirkung des Ultraschalles ist das Phänomen der "Kavitation" von großer Bedeu-

tung. DAKUBU (1976) und THACKER (1973) stellten bei der Beschallung von Bakterien- und Hefekulturen fest, daß eine Zellschädigung durch hohe Intensitäten erst dann auftrat, wenn "Kavitation" dazu kam; diese war als Bläschenbildung im beschallten Medium zu sehen. Eine exakte Bestimmung der US-Schädigungsschwelle lasse sich nur im "entgasten" Medium festlegen. THACKER hält die Kavitation für den primären Schädigungsmechanismus. Bei verschiedenen Autoren waren unter gleich hoher Ultraschallbeschallung, einerseits Zellzerstörung, andererseits keine Zerstörung beschrieben worden, ohne daß sie eine eventuelle Kavitation bei den Ergebnissen berücksichtigten. BRONSKAYA und EL'PINER (1970) berichten von einer erhöhten Zellzerstörung, wenn durch starken statischen Druck auf das Medium während der Beschallung die darin enthaltenen Gase mehr gelöst werden. Als Ursache für das Z e r b e r s t e n der Zellen sehen sie die Zerstörung der Zellmembranen, die das äußere Medium umgeben. So sei nicht nur die Intensität der Stoßwelle (und die Entfernung der Zelle vom Ausgangsort der Stoßwelle) wichtig, sondern die elastisch-viskösen Eigenschaften der biologischen Membranen und der physiko-chemische Zustand des Mediums, nämlich pH, Ionenzusammensetzung und Viskosität. So seien Rattenleberzellen bei Anwesenheit von Mg^{++} und Ca^{++} gegenüber Ultraschall sehr viel widerstandsfähiger, wobei Ca^{++} die Zellen noch besser vor den zerstörenden Wirkungen des US schützt als Mg^{++}, desgleichen eine isotone Rohrzuckerlösung mit Ca^{++} mehr als eine Trispufferlösung (pH 7,4) mit Ca^{++}.

Wie bereits oben erwähnt, wirkt Ultraschall im molekularen Bereich im Sinne einer S t e i g e r u n g d e r M e m b r a n d u r c h l ä s s i g k e i t für Wasser (MENDEZ et al., 1976). Ein K^+- V e r l u s t aus der Zelle und Verminderung des Nettoinfluxes kann durch entsprechende Wahl von Beschallungsdauer, Schallstärke und Temperatur (2 h, 0,4 - 1,2 W/cm^2, 1,8 MHz, 25 ^{o} und 37 ^{o} C) induziert werden (CHAPMAN, 1974). Nach Absetzen der Beschallung hört der K^+-Verlust auf, eine Regeneration des K^+-Dpots allerdings findet nicht statt. Als Ursachen dafür könne man eine Verbreiterung der Transportkanäle, die Vergröße-

rung der passiven Diffusion wie auch metabolische Veränderungen ansehen (CHAPMAN, 1974).

Bei Beschallung von Zellmembranfragmenten mit 8 - 10 W/cm^2 bei 750 kHz beobachteten EL'PINER und BRONSKAYA, 1970, einen Anstieg der Na^+-ATPase-Aktivität, einen Abfall der Mg^+-abhängigen ATPase-Aktivität. Bei längerdauernder Beschallung fallen beide Enzymaktivitäten ab.

WIDMER und PILET (1972) fanden eine Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels durch Ultraschall über die Abspaltung von niedermolekularen Peptiden oder Aminosäuren von der RNase, allerdings ohne Aktivitätsverlust bei fehlender Kavitation. Die RNase wird gespalten und inaktiviert bei Beschallung mit Auftreten von Kavitation. Die Inaktivierung bewirken OH-Radikale, die im wässrigen Milieu durch Kavitation entstehen (aus HILL, ENG, 1968: DNA-Verkleinerung bei Intensitäten von 30 W/cm^2, 1 MHz ohne Kavitation [HAWLEY, MACLEOD, DUNN 1963]).
O'SHEA und BRADBURY (1973) beschreiben die Spaltung von Proteinen in Abhängigkeit von einer Lösungsflüssigkeit.

3. Wirkungen auf die Haut

Die Reaktionen der Haut auf Applikation von Ultraschall scheinen nach der Literatur eindeutiger zu verlaufen. Die Autoren benützen im wesentlichen Gleichschall, meist im therapeutischen Bereich zwischen 0,5 W/cm^2 und 5 (10) W/cm^2 bei einer Durchschnittsfrequenz von ca. 800 kHz mit einer Beschallungsdauer von 5 - 30 min.
FANUCCI und BUSSI (1949) erwähnen die Beschallung von Leichenhaut durch A. BELLONE (1949). Er fände eine Gestalts- und Strukturveränderung der Basalzellen und im oberen Stratum Malpighi, die Kerne seien als pyknotische Lamelle an die Wand des Zellkörpers verschoben, während sie eine maulbeerartige Form annähmen, und das Chromatin lagere sich in Brocken am Umfang der Kernmembran, manchmal sogar im Zytoplasma an.

Andere Zeichen in Abhängigkeit von Schallintensität und Beschallungsdauer traten bei Beschallungen von "Lebendigem", Kaninchenohren und Rattenhaut auf: Hyperämie, Stase, hämorrhagische Blutungen, entzündliche Infiltrationen, zum Teil mit Blasenbildung im Plattenepithel, und schließlich bei höchster Intensität und Dauer Nekrosen (JANKOWIAK, 1969; WINARSKI, 1973; CHIRKINA, 1973; KARDUCK, RICHTER, 1975 und WITTENZELLNER, 1951).
CARSON und FISHMAN (1976) beschrieben eine Vakuolenbildung in der Stachelzellschicht. Grundsätzlich zeigten alle diese gesetzten "Läsionen" die Tendenz zur vollständigen Regeneration, deren Einsetzen in Korrelation zur Beschallungsdauer stand. "Spätschäden" konnten nicht entdeckt werden (KARDUCK, RICHTER, 1975; WITTENZELLNER, 1976).

C. SCHÄDIGUNG DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS, ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BETRACHTUNGEN

In der Literatur konnte ich keine elektronenoptischen Untersuchungen über mit Ultraschall beschallter Epidermis finden.
Ich möchte deshalb die "Schädigungsreaktion" der Epidermis auf chemische und physikalische Reize anhand elektronenmikroskopischer Betrachtungen aufzeigen, um ein mögliches "spezifisches Schädigungsmuster" der Epidermis auf "unspezifische Schädigungsarten" darlegen.

I. Chemische Reizstoffe

1. Kantharidin

Kantharidin, ein Extrakt aus dem getrockneten, spanischen Käfer LYTTA VESICATORIA FABRICIUS wirkt als starkes Phlogistikum. Es wurde deshalb als "Kantharidinpflaster" zur Erzeugung der bei einer lokalen, oberflächlichen Entzündung entstehenden Hyperämie benutzt (ZETKIN, SCHALDACH, 1978).

KOMURA (1968) untersuchte mit Kantharidinsalbe bestrichene Epidermis, von der 1 h nach Auftragen Biopsien gemacht wurden, um die ersten Schritte eine "kantharidininduzierten Akantholyse" genauer zu studieren.
Er fand vor allem im Stratum Malpighi eine Erweiterung der Interzellularräume, einen Abriß der Tonofilament-Desmosomenkomplexe vom Zytoplasma, wobei sowohl Zytoplasmaausläufer als auch Abrisse eine Membran besitzen.
Tonofilamente, Desmosomen, Ribosomen und Mitochondrien erschienen morphologisch intakt. Die Basalmembran mit den Hemidesmosomen sei unbeeinflußt.

Diese "Kantharidinakantholyse" entspricht nicht der von ORFANOS (1971) zusammengefaßten Definition von "echter Akantholyse", dort der Ablösung der Tonofilament-Desmosomenkomplexe vom Zytoplasma, hier nämlich der Auflösung des desmosomalen Zementes, Ablösung der Tonofibrillen aus der desmosomalen Verankerung und Erweiterung der Interzellularräume, wie etwa bei den Krankheiten der Pemphigus-Gruppe und Morbus Darier.

Ähnliche Veränderungen zeigten sich bei der "spongiotic vesiculation", von OFUJI und TABATA, BRAUN-FALCO und PETRY beschrieben (KOMURA, 1968), nämlich die Erweiterung der Interzellulärräume durch ein extrazelluläres Ödem; die Desmosomen sind als Brücken über die IZR gespannt und bleiben ziemlich lange so, bis sie schließlich auf beiden Seiten des Zytoplasmas abreißen, in sich aber intakt bleiben. Für die Entstehung macht man eine mechanische Zerreißung durch das extrazelluläre Ödem verantwortlich, während sie bei der "Kantharidinakantholyse" über eine endogene Enzyminduktion zustande kommen könnte (KOMURA,1968).

2. Kerosin und Aceton

Kerosin und Aceton, beides fettlösliche Agenzien lösen im industriellen Verwendungsbereich häufig Kontaktdermatitiden aus. Allerdings unterscheiden sich deren ultramikroskopischen Reaktionsweisen deutlich voneinander, wobei sich Kerosin als der intensivere Schädiger erweist. Vorgestellt werden Veränderungen 90 min nach Applikation der Substanzen auf die Epidermis (LUPULESCU et al., 1973).

Die Acetonwirkung auf das S t r a t u m C o r n e u m ist an folgendem zu erkennen: i n t r a z e l l u l ä r e s Ö d e m mit großen, ovalen Räumen, die granuläres Material enthalten; die Hornlagen der Umgebung sind verschoben und ebenfalls ödematös gequollen. Die Fibrillen- und Filamentenzahl ist vermindert, zwischen den Hornzellen liegende D e s m o s o m e n sind zerbrochen.

Im Stratum granulosum enthalten die Zellen zahlreiche, große Keratohyalingranula und kleine "electron dense bodies".

Im Stratum spinosum bilden Vakuolen paranukleäre Zisternen, die Membranstrukturen oder feines, granuläres Material umschließen. Mitochondrien erscheinen degenerativ verändert, die Tonofilamente sind verklumpt. Das endoplasmatische Retikulum ist normal, während das Chromatin des Kernes als Klumpen an dessen Rand sich anlagert. Die Kernmembran selbst verhält sich unregelmäßig und hinterläßt ein gezahntes Aussehen. Nukleolen sind gelegentlich zerstört, IZR erweitert und Desmosomen zerbrochen.

Keine Veränderungen kann man bei Basalzellen, Melanozyten und Langerhans'schen Zellen feststellen.
Degenerative Veränderungen an Melanozyten und Langerhans'schen Zellen hat lediglich SILBERBERG (1971) bei der Applikation von Quecksilberchlorid auf die Epidermis beschrieben.

Die Kerosinschäden sehen viel drastischer als die von Aceton aus:
Im Stratum corneum ist die Hornschichtzahl reduziert, das Hornmuster an sich aufgelöst. In großen lakunenhaften Räumen befinden sich Fibrillen; man entdeckt verdickte Plasmamembranen, pyknotische Kerne und Tonofilamentenklumpen.

Mehrere Zellen des Stratum spinosum besitzen Zeichen der Zytolyse, das Zytoplasma besteht zunehmend aus homogenem, strukturlosen Material, geschrumpfte Kerne, in denen das brokkige, reduzierte Chromatin an den Rand gelagert ist, Mitochondrienveränderungen, Tonofilamentenbruchstücke und erweiterte IZR.

Die Epidermis zeigt in der späten Phase nach Einwirkung dieser Agenzien deutliche Regenerationsvorgänge.

Als fettlösliche und fettlösende Substanzen entziehen sowohl Kerosin als auch Aceton der Epidermis die fettlöslichen Kompenenten. Aceton verursacht einen speziellen Typ von Vakuolenbildung, so wie sie auch BRAUN-FALCO (1971) nach Hornschichtablösung beim Meerschweinchen und NIX (1967) bei menschlicher Haut nach UV-Bestrahlung beschreiben, eine möglicherweise weniger spezifische Art der Zellschädigung. Kerosin zeigt dagegen eine Zytolyse, bei der das Auflösen des Hornmusters eine spezifische Schädigung darstellt; es werden im Stratum corneum Lipoproteine gespalten.

3. NaOH und HCl

Als weitere Beispiele für industriell ausgelöste obligate Kontaktdermatitiden gelten NaOH und HCl, deren Wirkungen in 1 N-Konzentrationen NAGAO et al. (1972) erforschten.

Bei den verhornten Zellen der Epidermis löst NaOH deren Inhalt auf, es bleiben nur Überreste von anscheinend intakten Membranen, die sich aneinander legen und Doppelmembranen formen.
In den nicht verhornten Epidermiszellen, besonders denen des Stratum granulosum und spinosum, dissoziieren die T o n o f i l a m e n t b ü n d e l in einzelne Filamente und werden schließlich homogen wie das übrige Zytoplasma; sie sind davon nicht mehr zu unterscheiden. Bei den D e s m o s o m e n verschwindet die interzelluläre, optisch dichte Schicht und auch die Haftplatten: die T o n o f i l a m e n t - D e s m o s o m e n k o m p l e x e haben sich aufgelöst. Von den M i t o c h o n d r i e n bleibt eine dunkle Matrix zurück. Ein intrazelluläres Ö d e m entsteht, die lamellären Granula werden dunkel und steigen in der Zahl an, die Keratohyalingranula werden homogen. Das C h r o m a t i n der Zellkerne weist ein spezielles, zerstreutes Muster ähnlich dem Bild der Karyolyse oder Karyorhexis auf.

Zellmembranen an sich und die Basalmembran bleiben intakt. Nur manchmal ist die dermoepidermale Basalmembran unterbrochen.
In der Endphase nach NaOH-Einwirkung sind die ganze Hornschicht, bei den nicht verhornten Zellen sämtliche Organellen außer Membranfragmenten verschwunden.

1 N HCl hinterläßt bei den verhornten Zellen nach der Einwirkzeit eine poröse Matrix mit runden "Löchern" und bildet ein intrazelluläres Ödem aus.
In den nicht verhornten Zellen bleibt der Tonofilament-Desmosomenkomplex erhalten und spannt sich über die durch ein interzelluläres Ödem weit gewordenen Interzellularräume aus. Die lamellären Granula sind zahlenmäßig stark gestiegen und ziemlich vergrößert. KHG erscheinen filamentös. Ab und zu findet man einen lokal begrenzten Bruch der Zellmembran. Das Chromatin wandert an die Kernmembran. Tonofilamente sind einzeln zu unterscheiden, die Basalmembran ist optisch etwas weniger dicht und der Abstand zwischen Basalmembran und Zellmembran wird enger.

4. Autolyse

Eine besondere Art Schädigung stellt die Autolyse dar. Hier erwartet man eine totale Zellschädigung und Zellzerstörung.
MIKHAYLOV (1973) beschrieb dazu an menschlichen Epidermiszellen bei 4 ^{o} und 37 ^{o} C folgendes:
Die Mitochondrien und Kanäle des eR schwellen an, die Nukleoproteidgranula des Kernes gehen zugrunde. Im Zytoplasma tauchen Vakuolen auf, während Ribosomen und fibrilläre Elemente zu homogenem Material zerfallen.
Die Zellmembran wird zerstört, der Kern wird pyknotisch, sein Inhalt verläßt die noch stabile Kernmembran.
Diese Vorgänge verlaufen in ihrer Geschwindigkeit temperaturabhängig.

II. Physikalische Einflüsse

1. Sog

Sog verursacht auf der menschlichen Haut Blasenbildung. Druck und Spannung sind fast physiologische Kräfte, wie sie z.B. beim Laufen auf die Fußsohle wirken oder als negative Druckkräfte, nämlich Sog, wie sie an der Haut von Fliegern, insbesondere Astronauten (HUNTER, 1974) auftreten können. HUNTER et al., 1974, untersuchten menschliche Epidermis unter Sogwirkung von -150 bis -300 mm Hg.

Sogkräfte verursachen bei den Keratinozyten folgendes:

Bereits zu Beginn des Sogs erscheinen in der Zelle von einer Membran umgebene V a k u o l e n , die durch ihre kernnahe Lage diesen halbmondförmig eindellen. Zwischen Kernbran und Vakuolenmembran bleibt jedoch eine schmale Zytoplasmabrücke erhalten. Zeitweise enthalten diese Vakuolen granuläres Material, das sich vorwiegend zur Peripherie der größeren Vakuolen hin sammelt. Unter zunehmendem Sog werden die Vakuolenmembranen unregelmäßiger, rupturieren und Zellinhalt wie Melanosomen, Melanosomenkomplexe und Membranbruchstücke ergießen sich in deren Lumen.

Zur Zeit der Blasenbildung entstehen um die großen, geplatzten, paranukleären Vakuolen noch zahlreiche, ebenfalls mit einer Membran umgebene kleine Vakuolen. Jetzt zeigen auch die M i t o c h o n d r i e n degenerative Veränderungen. Die Verteilung der T o n o f i b r i l l e n erscheint normal, obwohl sie durch die Vakuolenbildung näher zusammengepreßt werden.

An Melanozyten und Langerhans'schen Zellen sieht man weder Vakuolenbildung noch irgendwelche Zeichen einer Schädigung.

Ebenfalls im Stadium der Blasenbildung findet man eine zunehmende Erweiterung der I n t e r z e l l u l a r r ä u m e durch ein ausgeprägtes Ödem (vor allem am Blasenrand); manchmal enthalten diese weiten Räume das gleiche granuläre Material wie die paranukleären Vakuolen.

Die Blasenbildung ist morphologisch eigentlich die dermoepidermale Abtrennung. Der Spaltungsort ist meistens zwischen der Ba-

salmembran und der Zellmembran der Basalzelle, so daß die Basalmembran den Blasenboden bildet. Ganz selten sieht man gewisse Basalmembrananteile am Blasendach. Einzelne Keratinozyten und Melanozyten schwimmen gelegentlich in der Blasenflüssigkeit oder liegen am Blasenboden.

HÖNIGSMANN und WOLFF, 1973, (zitiert nach HUNTER, 1974) erklären die Vakuolenbildung als Erweiterung präexistenter Verbindungsräume zwischen endoplasmatischem Retikulum, Interzellularraum und Zellinnerem, eventuell entlang der Kanäle des eR. Daß Langerhans'sche Zellen und Melanozyten von den Wirkungen völlig unberührt bleiben, liegt nach HÖNIGSMANN und WOLFF, 1973, einerseits daran, daß eben keine Verbindungen zwischen dem Extrazellularraum und dem eR bestünden, andererseits könnten sich diese Dendritenzellen als Ganzes gemäß der einwirkenden Kräfte "bewegen" ohne durch stabile Zellkontakte wie Desmosomen u.a. in einer relativ fixen Stellung festgehalten zu werden und dadurch den Sogkräften um so stärker ausgesetzt zu sein.

Als zweite physikalische Noxe kann tangentialer Zug oder Reibung genannt werden. Hier ist der Blasenentstehungsweg ein anderer als der durch Sogwirkung. Es resultiert keine dermoepidermale Blasenbildung, sondern eine intraepidermale Blase.

2. Spannung - tangentialer Zug

Die morphologischen Veränderungen unter verschieden hohen Spannungskräften auf die Epidermis wurden auch von HUNTER et al., 1974, geprüft.

Als frühzeitige Erscheinungen (nach 5 min Spannung) sind ein i n t r a z e l l u l ä r e s Ö d e m in der Zellperipherie, welche ein granuläres Aussehen ohne Zellorganellen hat, zu sehen. In der Folge des Ödems erscheinen die T o n o f i l a m e n t e zusammengeklumpt und umrahmen wie eine "Halskette" (HUNTER, 1974) den Zellkern. Mancherorts bilden sich auch kleine V a k u o l e n in der ödematösen Peripherie und die

Zellmembranen dieser Zellen sind dann oft rupturiert, und ergießen ihren granulären Inhalt in kleine Ausweitungen des Extrazellularraumes.

Als Späterscheinung wird das intrazelluläre Ödem stärker, der Extrazellularraum zeigt größere Ausweitungen mit viel granulärem Material, die Zellorganellen sind verformt und zerstört. Die Vakuolen verlagern sich dann auch in Kernnähe, machen aber keine Kerndeformation wie etwa durch Sog entstandene Vakuolen. Desmosomale Verbindungen sind noch sichtbar, während sonst die Membranen ziemlich häufig rupturiert sind. Wenn der Zellinhalt in den Extrazellularraum geflossen ist, wird die entsprechende Zellhülle nekrotisch, es bildet sich eine kleine intraepidermale Blase; wenn sich diese Schädigung nun auf benachbarte Zellen ausdehnt, vergrößert sich die Blase; reißt diese Spannungsblase oder wird deren Dach abgerissen, so kommt es zu Erosio.

Melanozyten und Langerhans'sche Zellen scheinen durch Spannungskräfte nicht geschädigt zu werden.

3. Ultrastrukturelle Änderungen in der Epidermis nach Abziehen der Hornhaut

MISHIMA und PINKUS (1968) beobachteten diese Veränderungen in einem Zeitraum von 72 h nach Abziehen der Hornschicht.
Die Verbindungen von intrazellulären Tonofilamenten zu den Haftplatten der Desmosomen gehen verloren, die abgetrennten Tonofilamente verklumpen und reihen sich um den Kern. Die Desmosomen selbst werden nicht berührt, ihnen bleibt von der jeweiligen Nachbarzelle ein Membranstück, mit dem zusammen sie ins Zytoplasma der eigenen Zelle invaginiert werden. Weiterhin gehen interzelluläre Nexus verloren, die Zelloberfläche bildet zahlreiche, freie Mikrovilli in den Interzellularraum aus.
Insgesamt regeneriert sich die Hornschicht innerhalb von 72 h,

auch Desmosomen scheinen eher neugebildet zu werden, als daß alte repariert werden. Sie unterliegen nach RAKNERUD (1975) ebenfalls der Verhornung, also der Degeneration.
Ähnlich verlaufen diese Vorgänge auch bei akantholytischen Erkrankungen.

4. Hitzewirkung (Verbrennen)

TAKIGAWA und OFUJI (1977) "verbrannten" menschliche Epidermis mit einem 60 ^{o} und 95 ^{o} C heißen Medium und betrachteten die Biopsien elektronenmikroskopisch.
Bei 60 ^{o} C bilden sich im Zytoplasma nach 1 min V a k u o l e n , der Abstand zwischen den beiden Blättern der Kernmembran ist vergrößert; die Z e l l m e m b r a n rupturiert in der Nähe der Desmosomen, die unbeschädigt erscheinen, so daß diese die erweiterten Interzellularräume noch überbrücken. Kern und Organellen haben ein normales Aussehen.
Nach 3 min beginnt sich die Epidermis in Höhe der Basal- und Suprabasalzellen mit Blasenbildung abzuheben; entweder reißen die Interzellularbrücken (Zytoplasmaausläufer mit Desmosomen) oder die Basalzellen werden zerstört.
Insgesamt zeigt das Zellbild e r w e i t e r t e I Z R mit Abbruch der Brücken, V a k u o l e n im Zytoplasma wie auch in den Mitochondrien. Obwohl man oft die Zellmembran der Basalzellen nicht sehen kann, scheint die Basalmembran intakt. Die Kerne bleiben unverändert.
Bei 95 ^{o} C für 3 sec werden B a s a l z e l l e n und Suprabasalzellen völlig unordentlich:
Es tritt Epidermolyse ein, einerseits bleiben die zerstörten Basalzellen mittels der Halbdesmosomen hängen, andererseits findet man Halbdesmosomen isoliert an Tonofibrillen hängen oder sie sind in kleinen Haufen aneinandergelagert. Weiterhin prägen Tonofilamentaggregation, Plasmamembranbrüche und Karyorhexis das Bild.
Daß bei 95 ^{o} C die Interzellularräume erweitert sind, die Interzellularbrücken aber erhalten bleiben, mag daran liegen, daß das Gewebe durch die große Hitze schnell fixiert wurde, bevor

es reißen konnte.

PEARSON (1965) war zu ähnlichen Ergebnissen gekommen:
"we have demostrated that acantholysis is a common response of the epidermis to graded thermal stress, but other degenerativ process also occur" (S.498).
Er charakterisiert die Schädigung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der schädigenden Kraft (30 sec bis 2 h), bei seinen Versuchen nahm er ein "heißes Eisen", wobei er die Temperatur nicht benennt. PEARSON definiert verschiedene Stadien der Verbrennung:
"severe burn" (S.498) bedinge sofortige dermoepidermale Ablösung mit massiver Koagulationsnekrose. Elektronenoptisch finden sich die Auflösung des Zytoplasmas mit Verlust von Zellorganellen, aufgelöste Membranen, koagulierte Tonofilamente (zwar intakt, jedoch nicht mehr in einzelne Filamente zu unterscheiden) und anscheinend unbeschädigte Desmosomen.
"moderate burn" (S. 499) zeigt eine dermoepidermale Ablösung nach 15 bis 30 min. Sie erfolgt in der suprabasalen Schicht. Die oberflächlichen Zellagen der Epidermis erscheinen unbeeinflußt. Die Zellen trennen sich untereinander säuberlich jedoch mit "rauher Kontur", "rough acantholysis", d.h. durch Zellmembranbruch. Die stärksten Zellen reißen dabei die unbeschädigten Desmosomen an sich. Tonofilamente und Zellorganellen sind bei diesem Blasenbildungsprozeß relativ unbeschädigt.

Nach 30 bis 60 min besitzen die Zellen eine "weiche" Kontur, das Bild einer "smooth acantholysis" (PEARSON, 1965).
Die dermoepidermale Verbindung ist intakt, die Zahl der Tonofilamente ist abgesunken, sie liegen in großen Massen aggregiert. Außer einer gewissen Chromatinverklumpung zeigen die Kerne keine Veränderungen. Während die Zellorganellen merklich reduziert sind und die Desmosomenzahl abgenommen hat, sieht die Plasmamembran normal aus.
"mild burn" (S. 500) verursacht nur ein Erythem. Nach 20 min tritt nur ein intrazelluläres Ödem auf, nach 30 min ereignet sich eine frühe Blasenbildung und 40 min danach bilden sich

Blasen zwischen Basalzellen und Suprabasalzellen.

5. Kälte

Für Versuche zur Kälteschädigung der Epidermis verwendete PEARSON (1965) flüssigen Stickstoff (ca. -196 ° C).
Eine Blasenbildung erfolgt frühestens nach 30 min. Ultramikroskopisch findet man eine klare, exakte dermoepidermale Ablösung zwischen Basalmembran und Basalzellenmembran, wobei die Zelle selbst in einem erstaunlich gutem Erhaltungszustand zurückbleibt und nur sehr geringe degenerative Veränderungen zeigt.

6. Ultrazentrifugation

FINDLAY und LIEBENBERG (1976) verfolgen die Sedimentation von Zellteilen des Keratinozyten der menschlichen Epidermis nach Ultrazentrifugation.
Im "unbehandelten" Keratinozyten hängen die Melanosomen im Gitterwerk der Tonofilamente wie in einem Schirm über dem Zellkern. Durch die Ultrazentrifugation vollzieht sich eine räumliche Umverteilung der Zellorganellen verbunden mit gewissen morphologischen Änderungen der einzelnen Zellstrukturen. Der K e r n wandert nach oben, während die M e l a n o s o m e n , als elektronendichteste Zellkomponente zur Basis der Zelle sinken. Die Melanosomen stoßen dabei wie Hagelkörner sowohl an Kern- wie auch an Zellmembran und bilden Taschen aus oder machen Beulen in diese.
Bei den T o n o f i b r i l l e n sieht man Stadien von leichtem Bruch bis zur vollständigen Sequestration der gesamten Tonofilamentmasse. Die Tonofilamente ziehen sich von den Desmosomen zurück, agglutinieren und zerfallen in eine granuläre Struktur, gerade in der supranukleären Region. Sie setzen damit Melanosomen frei, enthüllen Lysosomenfragmente und Fetzen eines eR. Die aus dem Netz entlassenen Melanosomen haben ihre Membranen und auch ihre Elektronendichte verloren. An ihrer Oberfläche bilden sich Erosionen und Höhlungen.

Diese F i b r i l l e n m a s s e mit wachsender Dichte lagert sich nun zwischen dem noch dunkleren Kern und den weniger dunklen Ribosomen ab.
Die P l a s m a m e m b r a n der Basalzellen faltet sich stark und zeigt eine ausgeprägte Mikrovilli-Bildung zwischen den wenigen Desmosomen. Das Zytoplasma in den Mikrovilli ist klar und homogen.
Das e n d o p l a s m a t i s c h e R e t i k u l u m verliert seine äußeren Membranen, es bleiben runde und schlitzförmige Räume um den Kern zurück.
Beim K e r n können keine Anzeichen eines Schadens gesehen werden. Lediglich das kondensierte Chromatin entfernt sich vom Kernmembranrand und wandert entsprechend der Gravitation.
R i b o s o m e n sind in die Tonofibrillenmasse eingeschlossen, daneben gibt es auch freie, die die langsamste Masse der ganzen Zelle bilden.
Mitochondrien, Basalmembran, Desmosomen und Halbdesmosomen bleiben unbeeinträchtigt.

7. Ultraviolett-Bestrahlung

Bei UV-Bestrahlung beobachtet man vor allem in den Basalzellen und Zellen des Stratum spinosum viele große intraplasmatische Vakuolen, die optisch leer scheinen. Sie wandern im Rahmen der Keratinozytendifferenzierung bis in das Stratum granulosum hinauf. Einige von diesen Vakuolen treten im Stratum corneum als Lakunen in Erscheinung. Die Nukleolen des Stratum spinosum werden bei der UV-Bestrahlung größer. Im Verlauf einer beschleunigten Verhornung wächst das Stratum granulosum um einige Schichten an, die Anzahl und die Dicke der Tonofilamente steigen. Es vermehren sich auch die "membrane coating granules" und die Übergangsformen von Zellen zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum (NIX, 1967).

Diese Beispiele mögen genügen, um die durch Ultraschall bedingten Schädigungen einordnen zu können.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material

Für die Versuche wurden Biopsien gesunder Haut bei der Entfernung einer ausgedehnten Tätowierung an der Außenseite des rechten Oberarmes bei einem 25-jährigen Patienten verwandt. Zur Untersuchung kam unbeschalltes und dann sofort nach der Entnahme gemäß der Versuchsreihe mit Ultraschall beschalltes Gewebe.

II. Ultraschallbeschallung

1. Gerät

Die Beschallung nahmen wir mit dem Ultraschall-Therapiegerät Impulsaphon M 77 (Firma Dr. Born) vor. Dieses Gerät arbeitet mit der Schallfrequenz 1000 kHz. Bei einer maximalen Intensität von 3 W/cm^2 und einer strahlenden Fläche von 5 cm^2 beträgt die maximale Schalleistung 15 W.

2. Versuchsanordnung

Das zu beschallende Hautgewebe wurde spätestens 5 bis 10 min nach der Entnahme in eine Petrischale aus Plastik mit NaCl 0,9% (Zimmertemperatur) gelegt, so daß die Hautstückchen völlig von der Flüssigkeit bedeckt waren, und in diesem Medium auch beschallt. Der Ultraschallkopf befand sich unter der Schale. Wegen der starken "Kavitation" und der daraus resultierenden Wasserbewegung konnten die Biopsien nicht in einer Stellung gehalten werden, ohne bei der Kleinheit (4 - 5 mm^3) der Probe den Zellverband mechanisch zu schädigen.
Somit kann keine einheitlich gerichtete Beschallungsrichtung auf die Hautstückchen angegeben werden. Der Abstand Schallkopffläche zu Objekt betrug 0,5 bis 1 cm.

3. Versuchsdurchführung

Um die gerade bei höheren Intensitäten entstehende Wärmeentwicklung und die damit verbundene Zellschädigung zu reduzieren bzw. auszuschließen, wurden während der Beschallung gefrorene NaCl 0,9 %-Stückchen dazugegeben. Man konnte dadurch die Temperatur des Beschallungsmediums in der Nähe physiologischer Temperaturen, bei 32 °C (± 3 °C) ziemlich konstant halten. Diese Temperaturen wurden mit einer Temperatursonde sowohl im Medium wie auch von der Hautprobe gemessen (siehe Abb. 1).

Beschallt wurde mit Dauerschall (800 kHz) mit den Intensitäten:
I 1 W/cm^2, II 2 W/cm^2, III 3 W/cm^2;
bei Stufe I dauerte die Beschallung 5 min, bei der Stufe II 5 und 10 min, bei der Stufe III 5, 10, 20 und 30 min, und im weiteren Versuch: Stufe III, 30 min ohne Temperaturregelung (siehe Tab. 2).

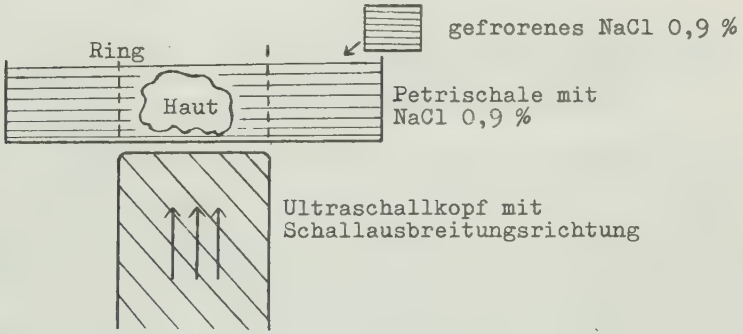
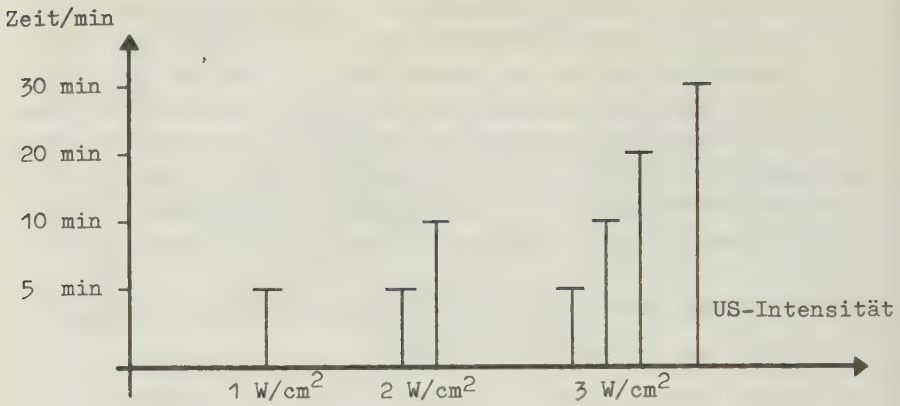


Abb. 1: Versuchsanordnung mit Ultraschallkopf und Petrischale. Das Hautstückchen wird von einem perforierten Plastikring über die Mitte des Schallkopfes gehalten.



Tab. 2: Beschallungsdauer und Beschallungsintensität

III. Elektronenmikroskopie

1. Präparationsmethodik

Nachdem sowohl die beschallten als auch die unbeschallten Hautbiopsien in kleine Partikel von etwa 1 mm^3-Größe zerteilt worden waren, wurde mit der Einbettung begonnen. Dazu wurden alle Objekte in einer Lösung, die aus 1 Teil Collidinpuffer und 2 Teilen 2 %igem Osmiumtetroxid besteht, bei pH 7,2 und 2 ^{o} C über 2 h fixiert und im Anschluß daran 15 min lang mit reinem Collindinpuffer ausgewaschen. Die Proben wurden dann über die aufsteigende Alkoholreihe - unter Nachkontrastierung mit 1 %iger Phosphorwolframsäure und 0,5 %igem Uranylacetat bei 70 %igem Alkohol - entwässert und mit Propylenoxid in ein Epongemisch gegeben. Dieses besteht im Verhältnis 1 : 1 aus einem Gemisch von Epicote 812 mit Dodecenylbernsteinsäureanhydrid und einem Gemisch von Epicote 812 mit Methyl-nadic-anhydrid. Dazu wurde noch 1,5 %iger Härter DMP 30 hinzugefügt. Die Polymerisation fand bei 60 ^{o} C über 48 h statt.

2. Durchführung

Am LKB-Ultrotome^{R} (Type 8810 A) wurden dann mit Glasmessern, die mit dem LKB-Knife-Maker (Type 7801 B) gebrochen worden waren, unter lichtmikroskopischer Kontrolle Ultradünnschnitte angefertigt, die auf mit Formvar beschichteten Kupfernetzen aufgefangen wurden.
Es wurden ausschließlich Schnitte der Epidermis mit Basalmembran hergestellt.
Die Schnitte wurden dann mit dem Elektronenmikroskop EM 9 S - 2 der Firma Zeiss betrachtet und auch photographiert.
Von den Schnitten aller Versuchsproben wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt, dann im einzelnen die Schichten der Epidermis, schließlich je eine typische Zelle einer Schicht mit ihren Organellen auf irgendwelche Veränderungen hin untersucht.

IV. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Epidermis, insbesondere des Stratum Malpighi, unter verschiedenen Beschallungsintensitäten

1. Keratinozyt und Nichtkeratinozyt im normalen Zellverband

Voraussetzung, die Änderungen, die Ultraschall bei Epidermiszellen verursacht, erkennen zu können, ist natürlich die zytobiologische Struktur normaler Keratinozyten und Nichtkeratinozyten, der Melanozyten und Langerhans'schen Zellen. Dies darf hier vorausgesetzt werden.

2. Morphologische Veränderungen des Keratinozyten durch Ultraschall

Veränderungen der Keratinozyten waren im wesentlichen und am deutlichsten im Stratum Malpighi, den Basalzellen und den angrenzenden "Stachelzellen" zu sehen, so daß eine ausführliche-

re Untersuchung der übrigen Schichten zugunsten jener beiden in den Hintergrund trat. Lediglich der Vollständigkeit halber wurden Übersichten über die ganze Epidermis betrachtet.

a) In der e r s t e n Untersuchungsstufe, Beschallungsintensität 1 W/cm^2 und einer Beschallungsdauer von 5 min kann gegenüber normaler, unbeschallter Epidermis kein morphologischer Unterschied zur normalen Epidermis erkannt werden.

Der Z e l l v e r b a n d ist regelmäßig und regelrecht, die Zellen selbst besitzen alle morphologischen Zeichen einer normal gebauten und funktionierenden Zelle mit ovalem, meist glatt begrenztem K e r n , der N u k l e o l e n , bisweilen auch Zentriolen aufweist, mit perinukleär angeordneten M i t o c h o n d r i e n , an die sich ebenfalls in einer perinukleären, kranzförmigen Art feine T o n o f i l a m e n t e anordnen. Diese, von den W u r z e l f ü ß c h e n ausgehend, umfassen den Zellkern und formieren sich am apikalen Zellpol zu einem "Dach". Unter diesem ordnen sich ebenfalls dachförmig M e l a n o s o m e n in Komplexen von einer Membran umgeben oder einzeln an, wobei alle Vorstufen zu differenzieren sind. Untereinander sind die Zellen über D e s m o s o m e n verbunden, die die beiden Plasmalemmata der anliegenden Keratinozyten fest aneinanderhaften; auch in den Bereichen zwischen den Desmosomen liegen zwei benachbarte Zellen mit ihren Membranen dicht aneinander, ein I n t e r z e l l u l a r r a u m bildet sich normalerweise erst im oberen Stratum Malpighi.
Zur Dermis finden sich H a l b d e s m o s o m e n , die sich mit der B a s a l m e m b r a n verbinden und in die Tonofilamente ragen.

b) Das Bild der z w e i t e n Versuchsreihe, bei einer Intensitätssteigerung auf 2 W/cm^2 und einer Dauer von 5 und 10 min, zeigt in dieser Stufe bei einer Beschallungszeit von 5 min gegenüber dem Bild der unbeschallten Epidermis nur ge-

ringe Änderungen.

Der Zellverband des ganzen Schnittes erscheint regelrecht. Die Basalmembran verläuft kontinuierlich; an den Bereichen, wo zwei Basalzellen aneinanderliegen, treten ausgeprägte Membranvesikulationen auf, die sich ins Zytoplasma vorschieben und dadurch zur Formation kleiner Mikrovilli führen. Die in die Desmosomen einstrahlenden Tonofilamente zeigen eine gewisse Verdichtung. Das Zytoplasma selbst erfährt eine Dichteverschiebung in die Peripherie. So sind im perinukleären Raum dort, wo sich sonst Mitochondrien befinden, häufig "optisch leere" Stellen zu erkennen. Bei den wenigen Mitochondrien ist die Innenmatrix verschwommen, eine gegliederte Struktur ist bei den vorliegenden Aufnahmen nicht zu erkennen.
Die durch die Peripherie ziehenden Tonofilamente bilden stark verdichtete, im einzelnen nicht als Filamente zu erkennende Bündel, die zum Teil quer angeschnitten erheblich verkürzt erscheinen; ringartig umgeben sie den Kern. Melanosomen tauchen unregelmäßig im Zytoplasma auf.

Im Stratum spinosum fällt ebenfalls ein freier perinukleärer Raum auf, Mitochondrien lassen sich vereinzelt als "Schatten" erkennen, Tonofilamente umgeben verkürzt, geschrumpft, mit verdichteter, klumpiger Formation den Kern, kurze, dichte und "gedrungene" Desmosomen prägen das Bild der Zellperipherie.

Die Übersichtsaufnahme derselben Beschallungsintensität (2 W/cm^2) aber über 10 min macht einen bunten, vielgestalteten Eindruck. Die Kerne des Stratum basale sind in unterschiedlicher Achsenausrichtung getroffen, intrazelluläre Anhäufungen von Tonofilamenten nehmen dem Bild die Gleichmäßigkeit.

Im einzelnen sind im K a r y o p l a s m a Zentriolen zu sehen, vereinzelt Nukleolen, der Kern ist leicht gelappt. Zwischen den Basalzellen wird der Abstand der sonst anliegenden Membranblätter größer, vesikelartig aufgeblähte Abschnitte wechseln mit aneinanderliegenden Plasmalemmabschnitten.
Die eigentlich kontinuierlich verlaufende B a s a l m e m b r a n wird an manchen Stellen sowohl auf der Seite der Basalzellen sowie der Basalmembran unterbrochen, wo sich statt dessen ein System von Membranen und Vesikeln zwischen zwei Basalzellen schieben (Abb. 2).
M i t o c h o n d r i e n werden im perinukleären Raum selten gesehen, man erkennt teils Cristaebildung teils auch keine differenzierbare Innenstruktur. Im Raum um den Zellkern imponieren wie im vorhergehenden Versuch ovale "Defekte", Aussparungen, die teilweise als Vakuolen ausgeprägt sind.
T o n o f i l a m e n t e , die sich besonders in den sogenannten Wurzelfüßchen verdichten und zu den Hemidesmosomen ziehen, sind kurz, stark gebündelt und ziehen häufig in großem Schwunge von beiden Seiten an den Zellkern heran und umfangen ihn. Andere Tonofilamente bilden kurze Wirbel, sind quer und längs geschnitten und umrahmen den Kern als Wirbelhäufchen, manchmal lockenähnlich (Abb. 3), scheinbar unzusammenhängend. Ansonsten prägen diese Tonofilamente den optischen Charakter der Zelle. An der Peripherie häufen sich Vesikel.
Ein Melanozyt war in diesem Präparat nicht angeschnitten.

Im S t r a t u m s p i n o s u m läßt sich gegenüber vorhergehenden Bildern nur bemerken, daß die Tonofilamente ebenfalls leicht verklumpt aussehen, wobei die Mitochondrien in der einen Zellhälfte, Tonofilamente vermehrt in der anderen Hälfte erscheinen. Vakuolen sind manchmal zwischen den Zellmembranen zu sehen.

c) Im dritten Versuch wurde die Haut mit 3 W/cm^2 beschallt. Da sich erst bei dieser Intensität ausgeprägtere Veränderungen zeigten, wurde die Beschallungsdauer in 5, 10, 20 und 30 min gestaffelt, um die Veränderungsstufen detailierter zu sehen.

In der Schicht der Basalzellen zeigen die Kerne nach 5-minütiger Beschallung eine runde bis leicht ovale Form. Im Kern imponiert ein großer, dichter Nukleolus. Um den Kern gruppieren sich Vakuolen und Lipideinschlüsse oft zu mehreren, sie befinden sich aber auch sonst im Zytoplasma. Einzelne Melanosomen, aber auch Melanosomenkomplexe sind über die Zelle verteilt. In manchen Regionen erscheint das Zytoplasma in der Art eines intrazellulären Ödems stark aufgelockert. Die Mitochondrien sind in diesem Präparat stark angefärbt, mit ungleichmäßiger Cristaedarstellung, vor allem im Bereich des oberen Stratum Malpighi (Abb. 4). Die Basalmembran verläuft kontinuierlich, obwohl gerade an den Stellen, wo zwei Zellen aneinderliegen, verzweigte Membranen sich entlang der Zellmembran zu schieben scheinen. Hierdurch wird ein geringer Interzellularraum freigelegt. Tonofilamente ziehen in kurzen Bündeln durchs Zytoplasma. Gerade zum Stratum spinosum hin findet man auch Zellen, zwischen denen ein interzelluläres Ödem ausgeprägt ist. Interzellularbrücken verschwinden, das Karyoplasma besitzt eine grobschollige Struktur, während im Zytoplasma zahlreiche Vakuolen verstreut sind (Abb. 5).

Im Stratum spinosum erkennt man ansonsten kaum Veränderungen. Es fallen die zahlreichen, sehr großen und bizarr geformten Mitochondrien auf, die auch in der Innenmatrix eine intensive Färbung zeigen. Tonofilamente umgeben wie in unbeschallten Präparaten in einem ununterbrochenen Kranz den Kern, sie sind kurz und strahlen dicht in die gedrungenen

Desmosomen ein. Markantere Veränderungen zeigt die Epidermis, die 10 min lang beschallt wurde.

Durch eine Erweiterung des Interzellularraumes sind die Plasmalemmata je zweier benachbarter Basalzellen außer an den Desmosomen so weit auseinandergedrängt, daß an vielen Stellen Zytoplasmaanteile mit den Tonofilament-Desmosomen-Komplexen zur jeweils anderen Zelle gerissen werden. Teilweise reißen diese Tonofilament-Desmosomen-Komplexe, die in ihrer Struktur fast unverändert, etwas aufgelockert zwar erscheinen, von den beiden Nachbarzellen Zytoplasma mit. Sie liegen in Massen im so entstandenen Interzellularraum ohne sichtbare Verbindung zur Zelle (Abb. 6). In deren Nähe zeigen sich viele V a k u o l e n und Mitochondrien, die sich besonders an der Zellperipherie zwischen den Tonofilamenten ansammeln. Die Cristae der M i t o c h o n d r i e n sind oft nicht parallel angeordnet. T o n o f i l a m e n t - i n s e l n liegen isoliert und dünne, gut differenzierbare Tonofilamente ziehen in die Desmosomen (Abb. 8).
An der B a s a l m e m b r a n bilden sich massenhaft V e s i k u l a t i o n e n , dringen in das Plasmalemm der Basalzellen vor und sind hier in den Wurzelfüßchen versammelt (Abb. 9). Weiterhin gehen von der Basalmembran kanalartig geformte, von einer Membran umschlossene Hohlräume aus und ziehen verzweigt in die Interzellularräume, ja bilden diese erst. An solchen Stellen scheint auch die Kontinuität der Basalmembran unterbrochen.
Die Z y t o p l a s m a d i c h t e stellt sich sehr unterschiedlich dar, einerseits gering und stark aufgelockert, zum anderen groß. Vor allem in der Zellperipherie sieht man viele Vakuolen, weit mehr als im perinukleären Raum. Melanosomen und Melanosomenkomplexe sind vorhanden.

Wie im Stratum basale treten auch im Zellverband des Stratum spinosum die stark erweiterten Zellzwischenräume auf, in denen richtige "Konglomerate" von abgerissenen Desmosomen mit

den kleinen Zytoplasmaanteilen schwimmen (Abb. 7). Daher erscheint der zurückgelassene Zelleib mikrovilliartige Ausläufer zu besitzen. Tonofilamente sind wellenförmig verdichtet; zahlreiche Mitochondrien liegen am Zellkern und zwischen den Tonofilamenten. Vakuolen findet man im ganzen Zytoplasma.

Bei 20-minütiger Beschallung mit der gleichen Intensität sehen nunmehr die Kerne der Basalzellen kleingelappt aus mit gleichmäßiger Plasmastruktur und ebenfalls gleichmäßiger Nukleolenstruktur. D e s m o s o m e n befinden sich wie bereits beschrieben, isoliert mit Zytoplasmaresten im Interzellularraum, in den die der Zelle zugehörigen Teile wie Mikrovilli ragen. Diese von Mikrovilli durchsetzten weitläufigen Zwischenräume ziehen durch den ganzen Zellverband des Stratum Malpighi, trennen Wurzelfüßchen von den dazugehörigen Zellen ab. Kurze, dicke T o n o f i l a m e n t b ü n d e l wellen sich durch das Zytoplasma. Zwischen ihnen liegen massenhaft Mitochondrien und Melanosomen verstreut (Abb. 10).
Die D e s m o s o m e n der Tonofilament-Desmosomen-Komplexe sehen plumper und verkürzt gegenüber den unbeschallten Exemplaren aus; die einstrahlenden Tonofilamente besitzen keine Verbindung zum Zytoplasma, sind stark verkürzt und verdickt. Sie bilden einen dichten Rand um das Desmosom. Einzelne Filamente sind nicht unterscheidbar. Die Substanzdichte im Zytoplasma ist regional verschieden. Viele Desmosomen sind auf den Bildern nur am Rande angeschnitten, so daß nur ein Tonofilamentklumpen auf dem Zytoplasmaausläufer imponiert. Der Abstand der Plasmamembranen von Basalzellen zur Basalmembran ist breiter, langgezogene Membransysteme gehen von der Basalmembran aus (Abb. 11), und erweitern sich zu den großen Interzellularräumen.
Zahlreiche pinozytotische Vesikel sind an der Basalmembran aufgereiht und wandern über die Wurzelfüßchen ins Zytoplasma.
Hier, zwischen den Tonofilamenten befinden sich auch viele

dunkel angefärbte Mitochondrien, bei denen nur selten eine Crista zu erkennen ist. Insgesamt scheint die Flächenausdehnung des Zytoplasmas zugunsten des Kerns abgenommen zu haben.

Im Stratum spinosum sind die Veränderungen der früheren Beschallungsversuche intensive, nämlich die Erweiterung der Interzellularräume mit Reißen der Interzellularbrücken im Zytoplasmabereich, Verdickung und Verkürzung der Tonofilamente.

In der zuletzt untersuchten Probe wurde die Beschallungsdauer bei 3 W/cm^2 auf 30 min ausgedehnt. Die bereits gefundenen Veränderungen in den Basalzellen steigern sich bis zur Zerstörung des Zellverbandes.

Die Zellen der Basalschicht sind zum Teil untereinander unzusammenhängend, unterbrochen von großen, "leeren" Zwischenräumen. In diesen ausgeprägten I n t e r z e l l u l a r r ä u m e n schwimmen Zytoplasmateile, Vakuolen mit homogenem Inhalt, Lamellenanordnungen ohne direkten Herkunftshinweis, Desmosomenhaufen und Mikrovilli-Zellschutt von zugrundegegangenen Zellen (Abb. 15). Daneben tauchen filigrane Membranhüllen auf, in denen zarte Vakuolen, teils ohne Inhalt, teils mit granulärem Material gefüllt, sich befinden (Abb. 14).
Die Z e l l k e r n e haben in ihrer Achsenstellung zur Epidermisoberfläche bzw. zur Basalmembran eine bedeutende Änderung durchgemacht. Sie stehen in ihrer Achse nicht mehr senkrecht, sondern parallel zur Basalmembran.
Offenbar ist das festigende Gerüst verloren. Die Kerne sind gelappt, ein Zeichen der zunehmenden Dedifferenzierung, wofür auch die Homogenisierung des Karyoplasmas und des Chromatins spricht. Es findet auch eine weitere Verschiebung der Kern-Zytoplasma-Relation statt: um die Kerne ist nur ein schmaler Zytoplasmasaum geblieben, den Tonofilamentklumpen und Melanosomen bilden. Die W u r z e l f ü ß c h e n sind von der Epidermis abgerissen. Sie sind anscheinend mit der

Dermis fester verankert, als mit den Basalzellen (Abb. 12). Entlang der Baselmembran fallen die fast in einer Reihe stehenden pinozytotischen Vesikel auf, die dann als Vakuolen die kurzen Tonofilamente in den Wurzelfüßchen durchsetzen. Melanosomen werden hier zahlreich beobachtet. Die B a s a l m e m b r a n ist aufgelockert, wobei die Kontinuität auf der Dermisseite erhalten geblieben erscheint, bis auf jene Stellen, wo die Zellmembranen zweier Keratinozyten auseinandergerissen sind. Die Abstände der beiden Laminae sind unterschiedlich breit, Halbdesmosomen sind wenig kräftig ausgebildet und unregelmäßig lokalisiert.
In Abb. 13 tauchen ein Erythrozyt und massig Keratohyalingranula im Stratum Malpighi auf, was in der unbeschallten Epidermis in dieser Schicht nicht vorkommt. In der Abbildung werden fast zwei Drittel des Zytoplasmas von eng aneinanderliegenden Vakuolen mit granulärem Inhalt eingenommen. Mitochondrien sind nur als Schatten ohne erkennbare Innenstruktur zu sehen.

3. Morphologische Veränderungen des Nichtkeratinozyten durch Ultraschall

Nichtkeratinozyten, Melanozyten und Langerhans'sche Zellen waren im Stratum Malpighi in allen Präparaten angeschnitten, so daß ein Vergleich der Verhaltensweisen gegenüber der Beschallung über alle Versuchsstufen hinweg möglich ist. Langerhans'sche Zellen, an ihren typischen Granula erkennbar, reagieren in gleicher Weise auf Ultraschall wie Melanozyten.

Erst ab einer Beschallungsintensität von 3 W/cm^2 über 10 - 20 min treten im Zytoplasma zahlreiche V e s i k e l , unregelmäßig verteilt, auf (Abb. 16). Der G o l g i -Apparat ist ausgeprägt und zeigt viele Erweiterungen. Von den M i t o c h o n d r i e n sind schattenhafte Außenstrukturen zu erkennen, während die Binnenmatrix bei einigen keine Differenzierung zuläßt und relativ homogen erscheint. Sie liegen an einer Zellhälfte zwischen den stark gelappten Kernausläufern versammelt. Die Zel-

le selbst liegt fest im Keratinozytenverband eingebettet.

Bei längerer Beschallungsdauer sieht man eine Entdifferenzierung des Zytoplasmas; große V a k u o l e n , in denen granuläres Material liegt (Abb. 17), nehmen weite Areale des Zytoplasmas ein. Dieses granuläre Material erscheint ebenfalls in den Buchten des stark gelappten Kernes. Das Chromatin liegt grobschollig an der Kernperipherie.
Schließlich liegt die Zelle losgelöst aus dem Verband wie die Keratinozyten von einem breiten Interzellularraum umgeben.
Der Zellkern bleibt isoliert mit einem schmalen Zytoplasmastreifen versehen, wo keine Organellen mehr zu differenzieren sind. An der Zellperipherie sind große Vakuolen mit körnigem Inhalt zu sehen.

E. DISKUSSION

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche spezifischen Schäden Ultraschall in der Epidermis bewirkt. Die Anregung hierzu kam aus dem bereits erwähnten Selbstversuch von E. WITTENZELLNER (1951) und seine Untersuchung über eventuelle Spätschäden.

Bei der Versuchsdurchführung und den anschließenden Betrachtungen der Zellveränderungen durch im therapeutischen Bereich liegenden Ultraschallintensitäten, 1 - 3 W/cm^2, für ca. 5 min, zeigten sich nur unspezifische Änderungen, in der Art der Spongiose, nach ORFANOS (1972), S. 85, eine entzündliche Spongiose: ein i n t e r z e l l u l ä r e s Ö d e m mit Reißen der Interzellularbrücken durch den Druck des Ödems. Die beteiligten Organellen, der Tonofilament-Desmosomen-Komplex bleibt dabei unberührt erhalten, es reißt in diesem Fall der "locus minoris resistentiae", nämlich die anliegende Zellmembran mit einem geringen Zytoplasmaausläufer. Weiterhin entstehen sekundär durch den Druck des extrazellulären Ödems in der Zelle spongiotische Bläschen, ein gewisses i n t r a z e l l u l ä r e s Ö d e m, das über den Mechanismus der Freisetzung proteolytischer Enzyme letztendlich auch zum Untergang des Keratinozyten führen könnte (ORFANOS).
Im einzelnen sieht man das "Ödem" in der Zellperipherie mit zahlreichen Vakuolen, dann Vesikeln in Kernnähe, wobei Tonofilamente und Desmosomen scheinbar zahlenmäßig verringert sind und die Mitochondrien Vakuolen und Myelinisierungsformen bilden. Das ist sehr gut in Abb. 5 (3 W/cm^2, 5 min Beschallungsdauer) zu sehen.
ORFANOS (1972) bezeichnet diese relativ unspezifischen Veränderungen als p r i m ä r e S p o n g i o s e , Folge einer dermalen Entzündung, wobei die Basalmembran für Flüssigkeit und Blutzellen aus dem Corium durchlässig geworden ist (z.B. Vorkommen eines Erythrozyten in Abb. 13, 3 W/cm^2, 30 min Beschallungsdauer).

Bei der s e k u n d ä r e n S p o n g i o s e läge der Grund bei defekten Kontaktzonen oder bei den Keratinozyten selbst, was wir ja bei unseren Ergebnissen verneinen müssen: im Vordergrund steht der intakte Tonofilament-Desmosomen-Komplex und die intakte Zelle.
Die Erscheinungen der primären, entzündlichen Spongiose werden auch vorwiegend im unteren Stratum Malpighi beobachtet.

Bei der Steigerung der Beschallungsdauer auf 30 min, eine Zeit wie sie in der Ultraschalltherapie in vivo nie erreicht wird, bildet insbesondere die Basalzelle das Bild des oben angelegten Zerstörungsmechanismus aus, wie er sich sekundär durch das interzelluläre Ödem bedingt entwickelt.
Durch den Druck des interzellulären Ödems reißen die Interzellulärbrücken im Gebiet der Zytoplasmaausläufer ab. Weiterhin entstehen in der Zelle selbst Vakuolen, peripher und perinukleär. Ob diese nun durch druckbedingte Dichteverschiebungen im Zytoplasma entstehen oder durch Einstrom von extrazellulärer Ödemflüssigkeit über eventuell präformierte Verbindungsräume wie etwa dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat, läßt sich nicht genau eruieren. Was auffällt, sind die Membranen der Vakuolen und Vesikel, deren Entstehung i n v i t r o meines Erachtens fraglich erscheint. Eher steht die Möglichkeit im Vordergrund, daß vorher ungefüllte Räume und Vesikel von endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat mit Ödemflüssigkeit prall gefüllt sind und deshalb dieses Erscheinungsbild entsteht.

Diese Möglichkeit sehen auch HÖNIGSMANN und WOLFF, 1973 (zitiert nach FINDLAY, LIEBENBERG, 1976). Die Entfaltung eines intrazellulären Kanalsystems in den Epidermiszellen durch Injektion von h o c h o s m o l a r e n Lösungen (NaCl, Dextran) in die Dermis. Das Kanalsystem könnte durch das endoplasmatische Retikulum repräsentiert werden, obwohl es in den "unbehandelten" Epidermiszellen nur spärlich zu sehen ist.

S o g wiederum (HUNTER et al., 1974 a) läßt große, paranukleäre, den Kern deformierende Vakuolenmembranen auseinanderbrechen und ihren Inhalt im interzellulären Raum erscheinen. Eine starke Flüssigkeitsaufnahme von Extra- in den Intrazellularraum läßt ebenfalls Öffnungen und Wege für den Transport annehmen.

Durch S p a n n u n g (HUNTER et al., 1974 b) werden zuerst die Tonofibrillen aus der Zellperipherie zurückgezogen, dabei zerbrechen Desmosomen und Zellmembranen. Im einzelnen treten auch hier intrazelluläres Ödem, Erweiterungen des Extrazellularraumes und benannter Membranbruch auf, der den Zellinhalt in den Interzellularraum ergießt und die Zelle nekrotisch hinterläßt.

FINDLAY und LIEBENBERG (1976) zeigten bei der U l t r a z e n t r i f u g a t i o n , daß es durch die relativ stabile Anordnung und Verteilung der Tonofilamente im Zytoplasma eigentlich nur drei Regionen für Flüssigkeitsansammlungen geben könne: perinukleärer, supranukleärer und peripherer Raum.
Da die perinukleäre Region tonofilamentfrei sei, sei sie der zuerst bevorzugte Raum für das Ödem. Wenn dieser Raum überlastet sei, könnte das dort vorhandene endoplasmatische Retikulum die Flüssigkeit auffangen. Als nächstes könne die supranukleäre Zone mit dem Golgi-Apparat und dem weitläufigen Geflecht der Tonofilamente kompensieren.
Von der Zellperipherie seien die Spitze und manchmal die Seite Ort der Flüssigkeitsansammlung.
Bei den beschallten Keratinozyten war auch eines der ersten Veränderungszeichen der breiter gewordene perinukleäre Raum, der vorher nur von Mitochondrien besiedelt worden war, die dann nach mehr peripher gedrängt wurden.

T o n o f i l a m e n t e scheinen Zellbestandteile zu sein, die durch die schädigenden Wirkungen häufig beeinflußbar waren. Ultraschall brachte die Tonofilamente über eine Verdickung und Verkürzung, dabei durch das Loslösen aus ihrem fest verankerten

Gitterwerk zu Wirbelbildungen gebracht, bis zu einer Agglutination, wo einzelne Filamente nicht mehr unterscheidbar waren. In der höchsten Belastungsstufe war manchmal eine Verklumpung zu sehen, das hieße, eine Destruktur ihrer Substanz.
Den gleichen Reaktionsweg gehen Tonofilamente nach Ultrazentrifugation (FINDLAY, LIEBENBERG, 1976), nach Ablösen der Hornlage (MISHIMA, PINKUS, 1968), nach Spannungsbelastung (HUNTER, McVITTIE, COMAISH, 1974), nach Wärmezufuhr bis zur Verbrennung (PEARSON, 1965 und TAKIGAWA, OFUJI, 1977) und bei Ultraschallbeschallung mit hoher Intensität (3 W/cm^2) und langer Beschallungsdauer (30 min) o h n e Wärmeableitung, worauf ich später noch hinweisen möchte.
Bei den chemischen Agenzien löst NaOH als starke Lauge das Keratin der Tonofilamente völlig auf (NAGAO et al., 1972), Aceton und Kerosin zerbrechen und verklumpen die Tonofilamente (LUPULESCU et al., 1973), während der autolytische Zerfallsprozeß die fibrillären Elemente homogenisiert (MIKHAYLOV, 1973).

Als widerstandsfähigstes Organell des Keratinozyten bleibt bei fast allen besprochenen zerstörenden Einflüssen das D e s m o s o m übrig. Es bleibt unangetastet durch physikalische Einflüsse, wie sie in vivo wohl die wesentlichen Beanspruchungen der Epidermis darstellen.
Durch die Lipidlöser Aceton und Kerosin werden die Desmosomen teilweise gebrochen (LUPULESCU et al., 1973) und nur NaOH vernichtet die Desmosomensubstanz vollständig durch Auflösung (NAGAO et al., 1972).
Eine Schädigung der anderen Z e l l e l e m e n t e wie Kern, Mitochondrien (Melanosomen ausgenommen) und Ribosomen würde immer mit einem Zugrundegehen der Zelle beantwortet werden, da diese für die Existenz notwendige Zellbestandteile darstellen. Der Vorgang entspricht dann dem der Zytolyse mit Kernpyknose, die Mitochondrien schwellen an und verlieren ihre Binnenmatrix, das Zytoplasma wird homogen und zerfällt. Den Abtransport besorgen dann Makrophagen.

Neben der Betrachtung der Keratinozyten der Epidermis möchte ich noch auf die zweite dort anzutreffende Zellart, den Nichtkeratinozyten, Melanozyten und Langerhans'sche Zellen eingehen.
Von allen den erwähnten Schädigungsversuchen konnte nur SILBERBERG (1971) bei der Applikation von Quecksilberchlorid degenerative Veränderungen feststellen.
Bei den Ultraschallversuchen mit hohen Intensitäten (3 W/cm^2) entwickeln die Nichtkeratinozyten massenhaft Vakuolen, die den Großteil des Zytoplasmas einnehmen, wodurch der Zelluntergang eingeleitet wird.

Die Basalmembran, Verankerung der Epidermis in der Dermis und Barrière zwischen innerem und äußeren Milieu, wird durch Chemikalien, die auf die Hautoberfläche wirken, nicht beeinflußt.

In den Ultraschallversuchsreihen wurde die Breite der Basalmembran gemessen, d.h. der Abstand zwischen der Membran der Basalzelle und der Basalmembran. Er betrug in unseren Präparaten unbeschallt 0,04 µ (Mittelwert) und vergrößerte sich bei der höchsten Intensität, 3 W/cm^2, und längsten Beschalldauer, 30 min, auf 0,1 µ (Mittelwert).
Nach HEAPHY et al. (1977) beträgt die Durchschnittsbreite der Basalmembran 600 - 800 Å (entspricht 0,06 - 0,08 µ), woraus man eine geringe Verbreiterung erkennen könnte.

Eine dermoepidermale Ablösung findet bei unseren Ultraschallversuchen innerhalb des gesetzten Rahmens nicht statt. Wohl aber beschreiben HUNTER et al. (1974) nach Sog eine Blasenbildung, der die Spaltung zwischen Basalzellenmembran und Basalmembran vorausgeht, während die gleichen Autoren nach Aufsetzen von Spannung auf die Epidermis nur intraepidermale Blasen provozieren konnten (nekrotische Zellen hinterließen einen Defekt im Zellverband, eine Ausweitung dieses Baumes führt dann zur Blasenbildung).

Eine klare dermoepidermale Trennung mittels Blasenbildung fanden PEARSON (1965) mit Kälte (flüssiger Stickstoff) und TAKIGAWA et al. (1977) mit 95 ^{o} C Hitze.

Nach unseren Ergebnissen muß man den Ultraschall unter den Versuchsbedingungen, die wir verwendet haben, als Schädiger unspezifischer Art einordnen. Die destruierende Komponente mögen wohl Druckkräfte sein, die über den Einstrom von Ödemflüssigkeit durch die Basalmembran in Interzellularspalten und von dort in die Zelle selbst, die beschriebenen Reaktionen bis zur Zytolyse der Basalzellen auslösen.
In einem Nebenversuch hatten wir Epidermis mit 3 W/cm^2 30 min lang beschallt, ohne die durch Kavitation entstandene Wärme über Kühlwasser abzuführen. Destruktiv wirken hier sowohl Wärme als auch Ultraschall: Ein buntes Übersichtsbild der Epidermis (Abb. 18), der Zellverband ist auseinandergefallen. Man erkennt stark gelappte bis pyknotische Kerne mit "getigerter" Innenstruktur. Um die Kerne liegen kranzartig Tonofilamentklumpen.
Wo früher nur kleine Areale von Tonofilamenten waren, sind nur Keratintropfen vorhanden (Abb. 18). Von den anderen Organellen ist nichts zu sehen außer massig granulärem Material zwischen Kernen und Tonofilamenten. Der einzige Zellteil, der wohl erhalten ist, sind die Desmosomen, die quasi als "letzte Überlebende" zwischen den Tonofilamentklumpen liegen und diese zusammenhalten (Abb. 19).

Für die Bewertung der Versuche muß man berücksichtigen, daß dies unter in vitro-Bedingungen durchgeführt und untersucht wurde. Einerseits werden bei der Ultraschalltherapie nicht solch hohe Intensitäten verwendet, auch nicht für eine so lange Dauer wie 30 min, sondern etwa 5 min. Zum anderen kann die lebende Epidermis im Zusammenwirken mit dem Gesamtorganismus viele Vorgänge kompensieren, z.B. den Wärmeabtransport durch gesteigerte Durchblutung, so daß man von einer bleibenden Schädigung unter den Versuchsbedingungen für die menschliche Epidermis nicht sprechen kann.
Wohl aber findet man im Ultraschall bei entsprechender Dosierung und Anwendung eine Möglichkeit, um Zellen einer Zytolyse, einer Zerstörung zuzuführen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, mittels Beschallung mit Ultraschall (nach Intensität und Dauer gestaffelt), bei gesunder, menschlicher Epidermis (in vitro) eine Schädigung zu verursachen. Insbesondere wurde das Stratum Malpighi untersucht, da sich gerade in der germinativen Schicht Veränderungen zeigten.

Nach kurzem historischen Rückblick und einem Überblick über die physikalischen Grundlagen sowie die biologischen Wirkungen des Ultraschalls wurden in der Literatur beschriebene Schädigungen der Zelle durch Ultraschall beschrieben.

Für den elektronenoptischen Vergleich von Schädigungen menschlicher Epidermis wurden Beispiele durch chemische Stoffe und physikalische Vorgänge dargelegt und ausgeführt.

In den eigenen Untersuchungen werden die Ergebnisse differenziert nach Beschallungsintensität und Beschallungdauer beschrieben - sowohl bei der Langerhans'schen Zelle und dem Melanozyten, wie dem Keratinozyten des Stratum Malpighi.

Es wurden gefunden:

1. Schädigung der Mitochondrien,
2. Ablösung der Tonofilament-Desmosomen-Komplexe vom Zytoplasma ohne Desmosomenschädigung,
3. Tonofilamentverklumpung,
4. intra- und interzelluläres Ödem,
5. Kernschädigung,
6. Auflockerung der Basalmembran,
7. Auflösung des geregelten Zellverbandes.

Dieser Schädigungstyp wird mit Ergebnissen anderer Autoren diskutiert, die ebenfalls ein Schädigungsmuster in menschlichen Epidermiszellen durch chemische Stoffe und physikalische Kräf-

te verursacht, fanden.
Der Schädigungsmechanismus wurde als rein physikalischer Vorgang angesehen.

G. BILDTEIL

Alle Bilder stammen von einem Hautstückchen des lateralen Oberarmbereiches eines 25-jährigen Mannes.
Angeschnitten ist die mit Osmiumtetroxid fixierte Epidermis im Basalbereich.

Abkürzungen:

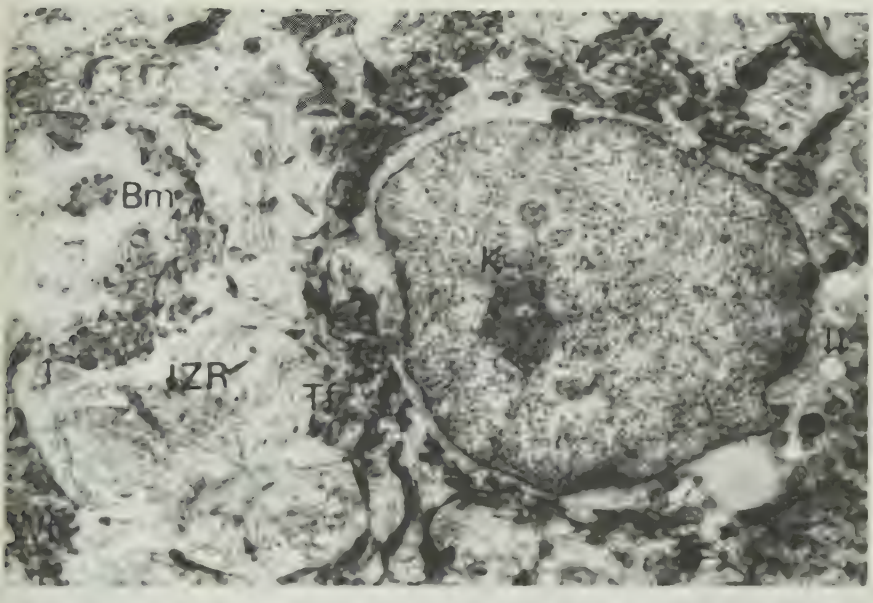
Bm	Basalmembran
BZ	Basalzelle
De	Desmosom
E	Erythrozyt
eR	endoplasmatisches Retikulum
Go	Golgi-Apparat
Hd	Halbdesmosom
IZR	Interzellularraum
K	Kern
KHG	Keratohyalingranula
Ko	Kollagen
Me	Melanosom
Mi	Mitochondrium
Mv	mikrovilliartige Fortsätze
Nk	Nichtkeratinozyt
Tf	Tonofilamente
Va	Vakuolen
Ve	Vesikel
Wf	Wurzelfüßchen

Abb. 2: Beschallung 2 W/cm^2 10 min

Man erkennt eine Basalzelle mit Basalmembran (Bm). An manchen Stellen scheinen von Unterbrechungen der Basalmembran Membranfalten und Vesikelsysteme (↑) auszugehen. Sie schieben sich zwischen Zellen und trennen hier die Wurzelfüßchen (Wf) von der Basalzelle. Kurze Tonofilamentbüschel (Tf) umgeben den Kern (K). Die Zellorganellen sind in eine Zellhälfte verschoben (↑↑). Es bilden sich Interzellularräume (IZR).
Vergr. 16 170-fach

Abb. 3: Beschallung 2 W/cm^2 10 min

Ausgeprägte Tonofilamentwirbel (Tf) umgeben den Zellkern.
Vergr. 28 000-fach


Bm
IZR
Tf
K
L

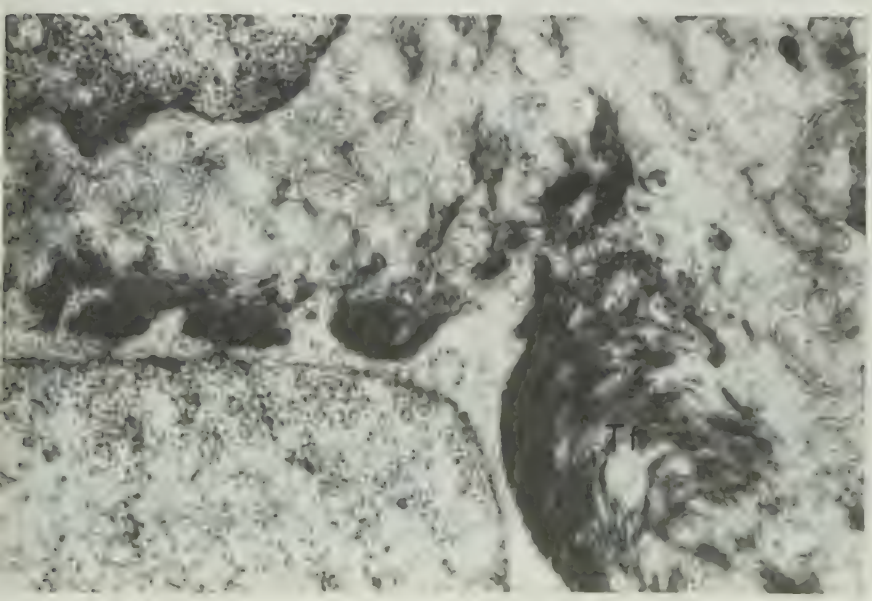
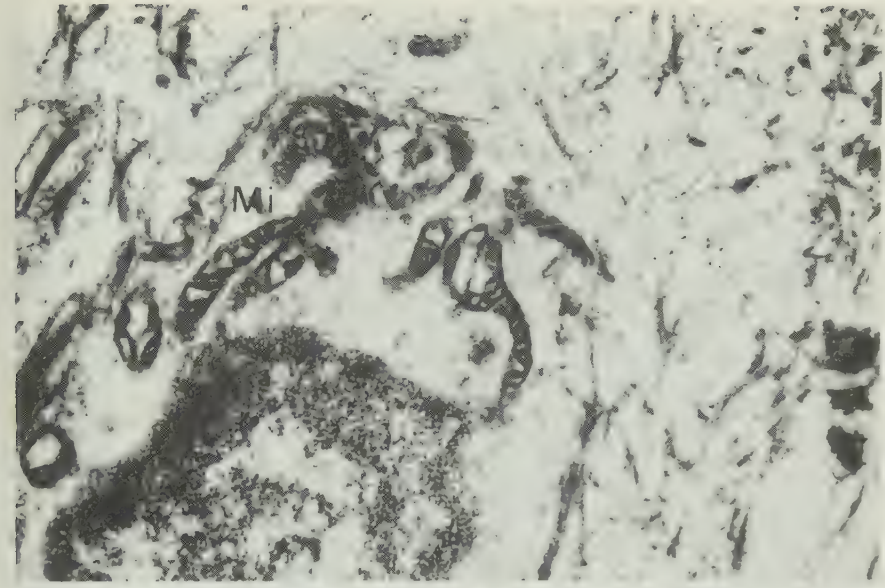

Tf

Abb. 4: 3 W/cm^2 5min

Bizarr geformte und aufgetriebene Mitochondrien (Mi) einer Zelle des oberen Stratum Malpighi.
Vergr. 33 000-fach

Abb. 5: 3 W/cm^2 5 min

Abgebildet ist eine Zelle des Stratum spinosum mit zahlreichen Vakuolen (Va) und Mitochondrien (Mi) im ödematös aufgelockerten Zytoplasma. Die Interzellularbrücken sind durch das extrazelluläre Ödem teilweise gerissen und verschwunden. Es bleibt ein breiter Interzellularraum (IZR) zurück.
Vergr. 16 170-fach


Mi

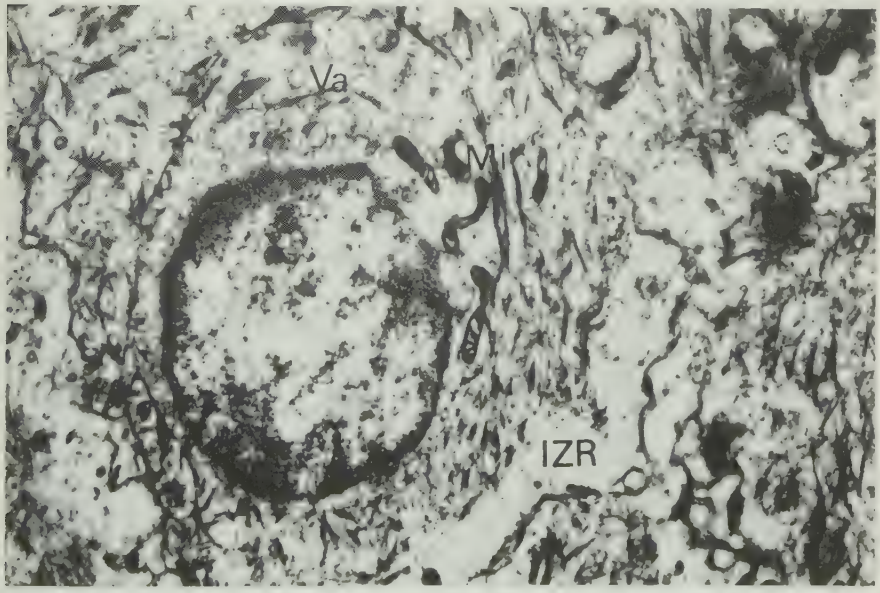

Va
Mi
IZR

Abb. 6: 3 W/cm^2 10 min

Basalmembran (Bm) mit angrenzender Basalzelle. In den weiten Interzellularräumen (IZR) "schwimmen" Tonofilament-Desmosomen-Komplexe (De) wie Inseln.
Vergr. 16 170-fach

Abb. 7: 3 W/cm^2 10 min

Ausschnitt aus dem Interzellularraum mit Tonofilament-Desmosomen-Komplexen (De) und kurzen, zarten Tonofilamenten (Tf), zwischen denen sich viele Mitochondrien (Mi) befinden. Links oben ragt der Ausläufer eines Nichtkeratinozyten (Nk) in den Bildausschnitt.
Vergr. 33 000-fach

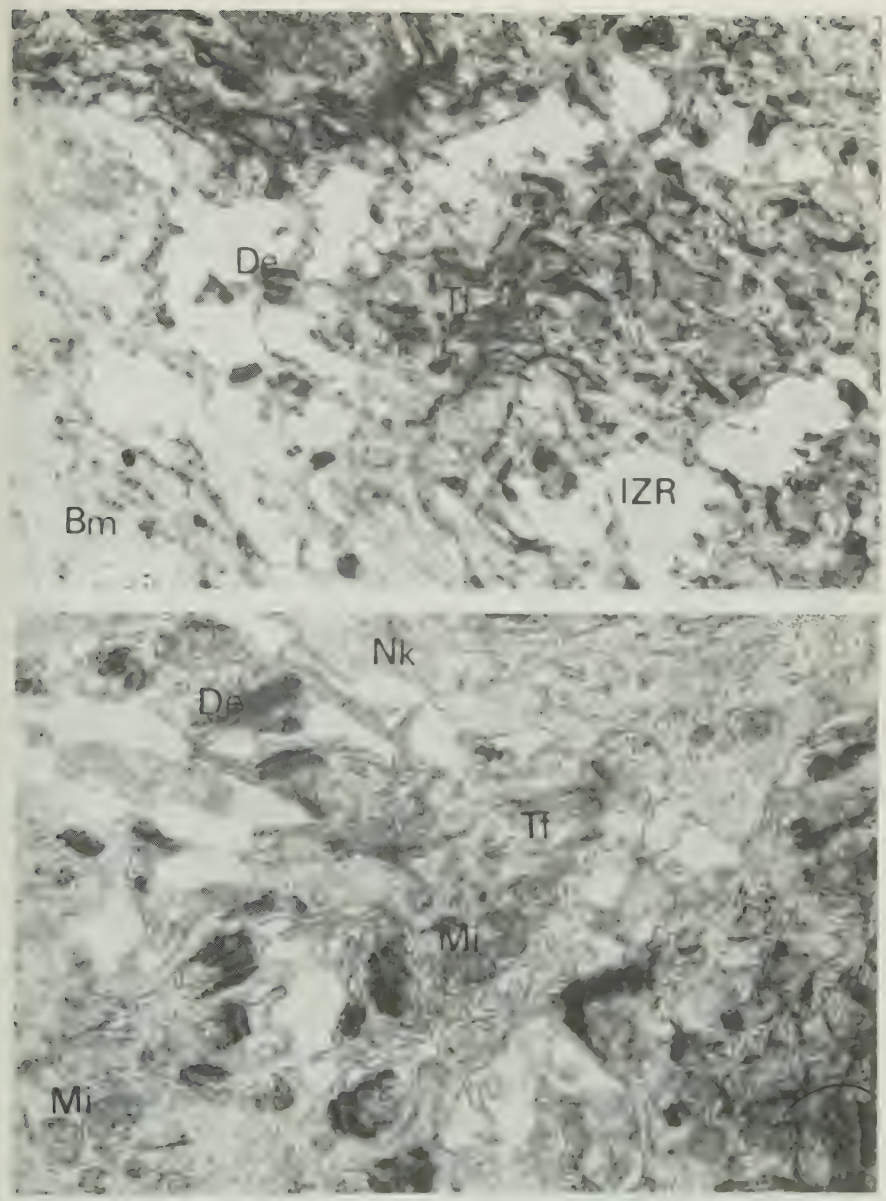
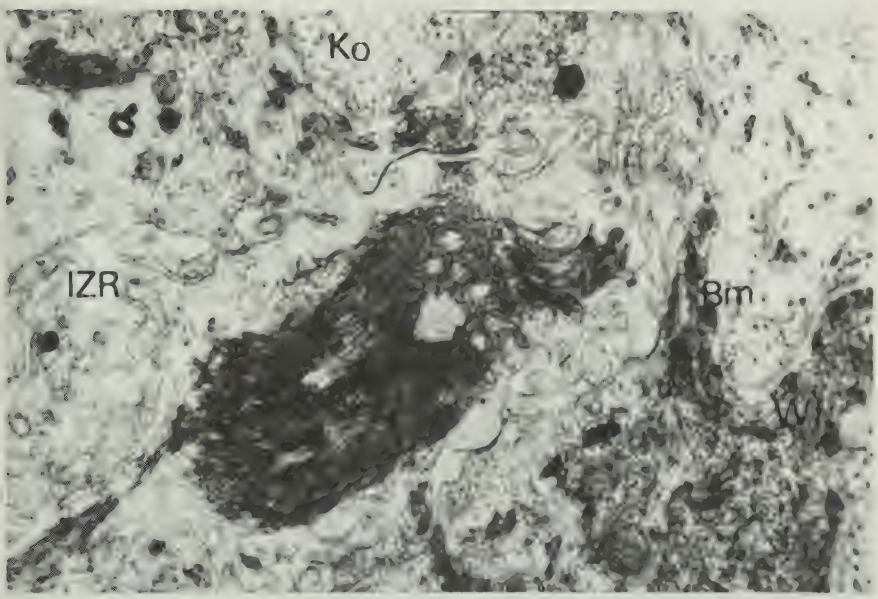

De
Tf
IZR
Bm
Nk
De
Tf
Mi
Mi

Abb. 8: 3 W/cm^2 10 min

Basalmembran (Bm) mit isoliertem Tonofilamentrasen (Tf) in einer Basalzelle. Zahlreiche Membransysteme durchziehen das Wurzelfüßchen (Wf) und erweitern sich stellenweise blasenförmig zum Interzellularraum (IZR). In der angrenzenden Dermis sind viele Kollagenfibrillen (Ko) quer angeschnitten.
Vergr. 33 000-fach

Abb. 10: 3 W/cm^2 20 min

Ausschnitt zweier Basalzellen mit Basalmembran (Bm), die durch einen breiten Interzellularraum getrennt sind. In den Interzellularraum (IZR) ragen mikrovilliartige Ausläufer (Mv). Die Tonofilamente (Tf) zeigen eine Verdichtung und sind in wellenförmigen Zügen im Wurzelfüßchen verteilt.
Vergr. 18 130-fach


Ko
IZR
Bm
W

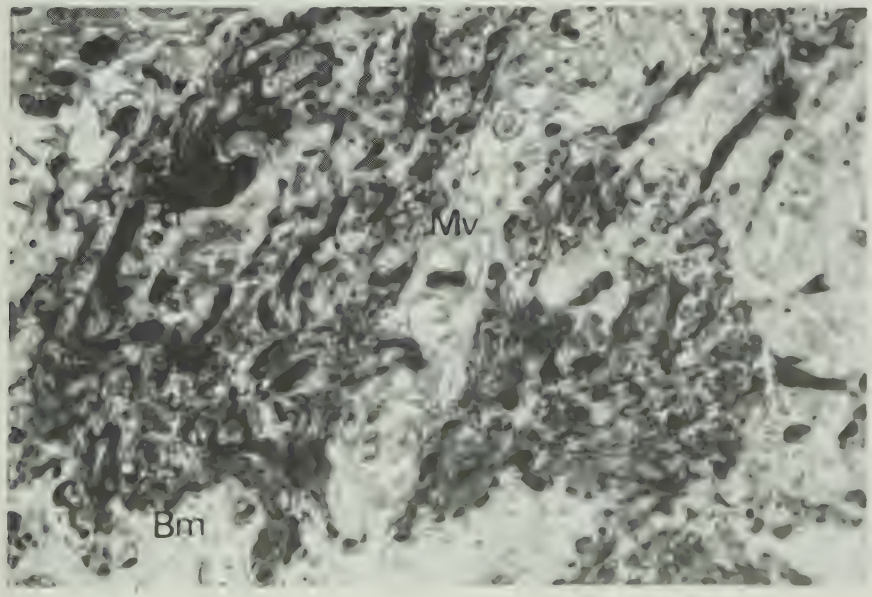

Mv
Bm

Abb. 9: 3 W/cm^2 10 min

Wurzelfüßchen, von dem aus viele pinozytotische Vesikel (Ve) in die Zelle wandern. Zwischen den kurzen Tonofilamenten (Tf) sieht man einen Melanosomenkomplex (Me). Ansonsten strahlen die Tonofilamente in die Halbdesmosomen (Hd) ein, den Haftstellen zwischen Basalmembran (Bm) und Basalzelle. In der anliegenden Dermis sieht man längs geschnittenes Kollagen (Ko).
Vergr. 141 000-fach

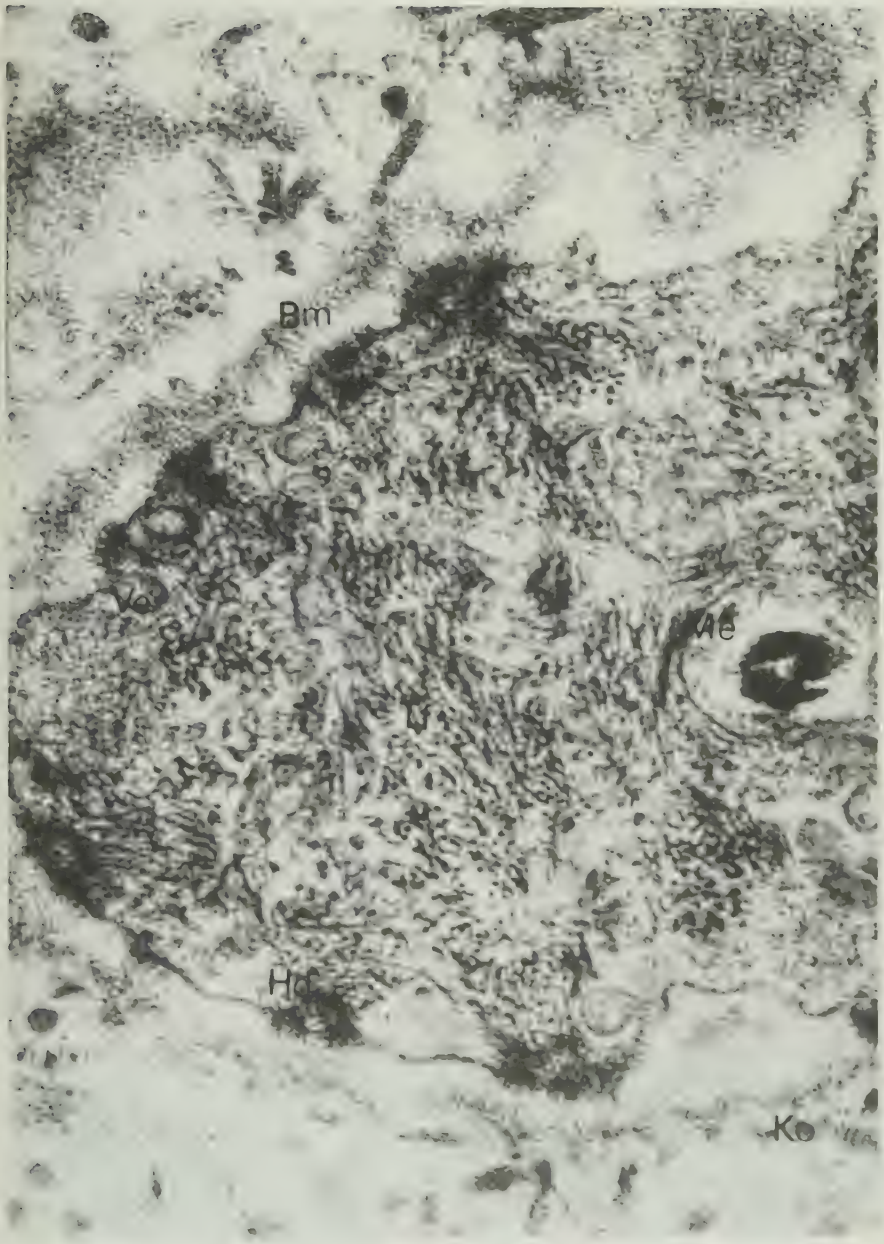

Bm
Ko
Ae
Ko

Abb. 11: 3 W/cm^2 20 min

Hier öffnen sich von der Basalmembran (Bm) ausgehend Membransysteme, die sich schließlich zu einem weiten Interzellularraum verzweigen. Rechts unten Kollagenfibrillen (Ko) der Dermis.
Vergr. 141 000-fach

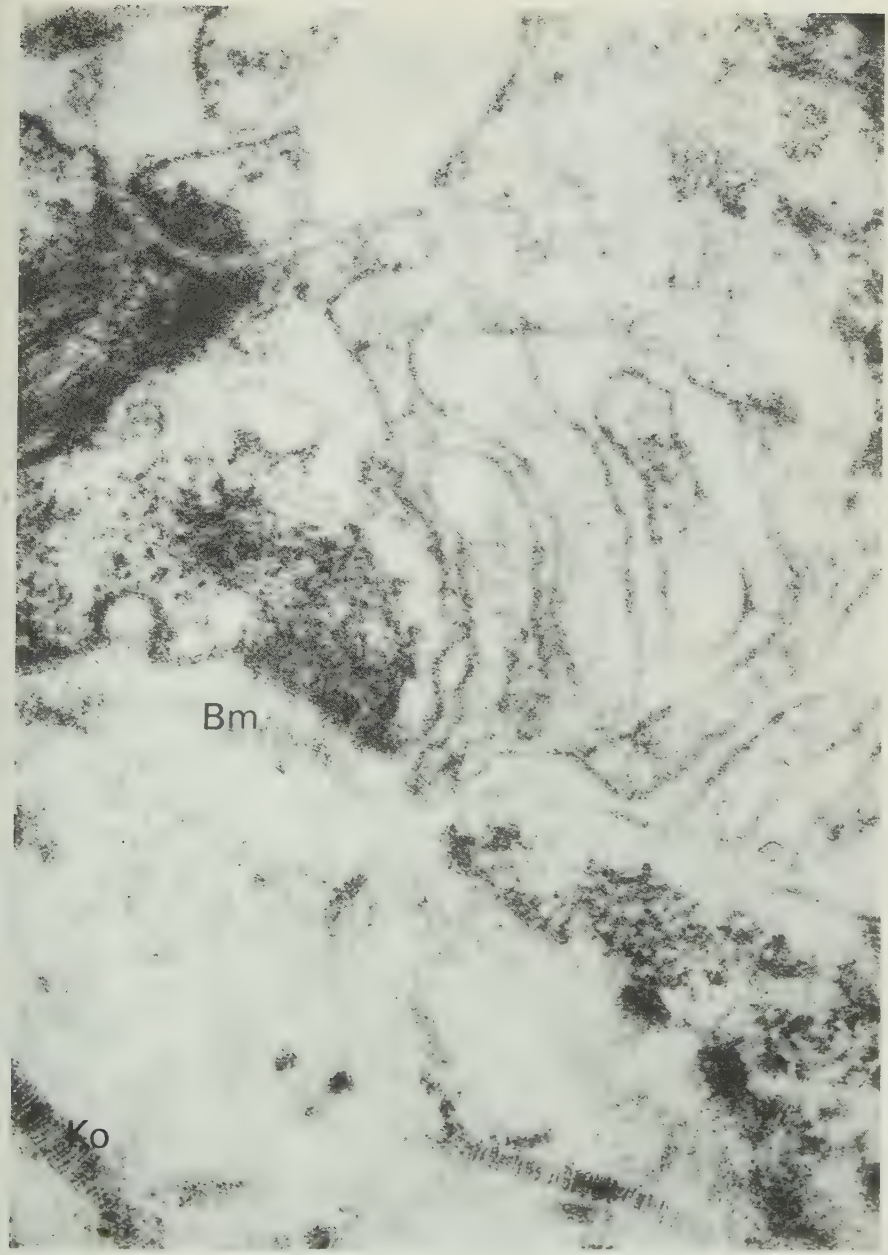
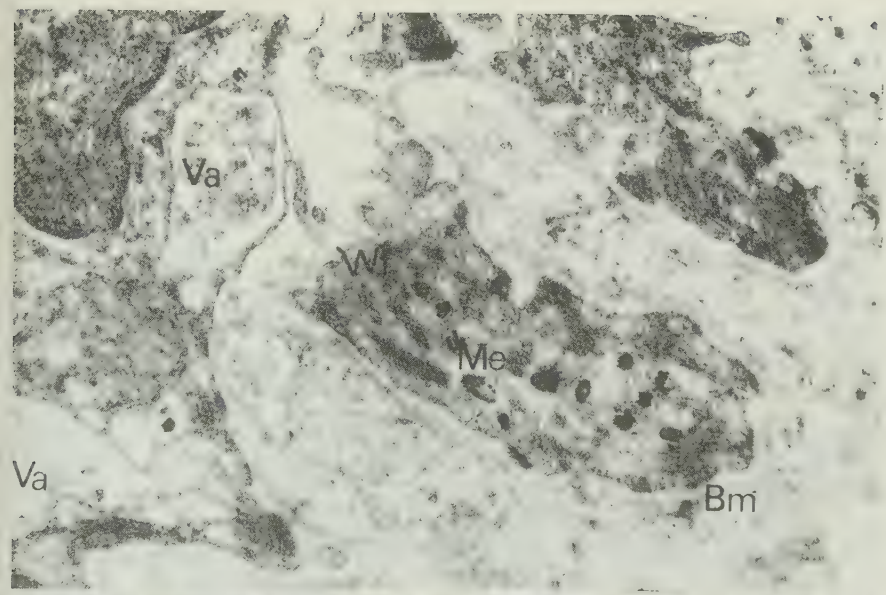

Bm
Ko

Abb. 12: 3 W/cm^2 30 min

Basalzelle (BZ) mit Basalmembran (Bm) und abgetrenntem Wurzelfüßchen (Wf). Entlang der Basalmembran und im gesamten Wurzelfüßchen befinden sich zahlreiche pinozytotische Vesikel und viele Melanosomen (Me) versammelt. Am Zellrand eine große, mit granulärem Material gefüllte und eine optisch leere Vakuole (Va). Weiterhin erkennt man eine Auflockerung der Basalmembran.
Vergr. 33 000-fach

Abb. 13: 3 W/cm^2 30 min

Zelle aus dem Stratum Malpighi. Der Hauptanteil des Zytoplasmas ist durch Vakuolen (Va) ersetzt. Ein Erythrozyt (E) schmiegt sich an dem zerklüfteten Kern (K), über die Zellen verstreut größere und kleinere Keratohyalinschollen (KHG).
Vergr. 16 170-fach


Va
Wf
Me
Va
Bm

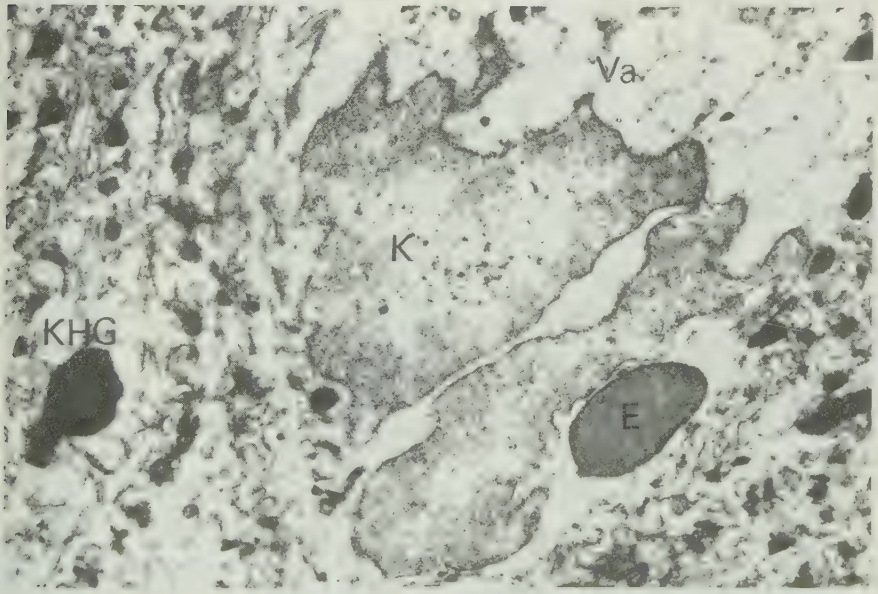
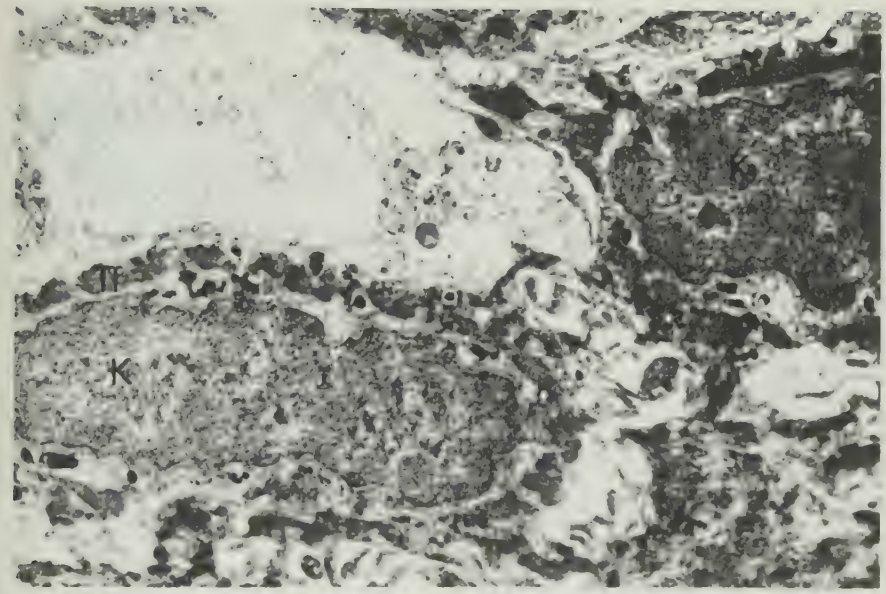

Va
K
KHG
E

Abb. 14: 3 W/cm^2 30 min

Ausschnitt von Keratinozyten des Stratum Malpighi mit gelapptem Kern (K) und einem schmalen Zytoplasmasaum, der überwiegend von agglutinierten Tonofilamenten (Tf) gebildet wird. Zwischen den Zellen filigrane Membrangebilde, die teilweise granulären Inhalt haben.
Vergr. 16 170-fach

Abb. 15: 3 W/cm^2 30 min

Basalmembran (Bm) mit zwei Basalzellen, deren Kernachse parallel zur Basalmembran liegt. Zwischen Basalmembran und Basalzellen besteht keine Verbindung mehr. Im weiten Interzellularraum (IZR) schwimmen abgetrennte Zytoplasmaanteile mit riesigen Vakuolen und membranösem Material.
Vergr. 16 170-fach


K

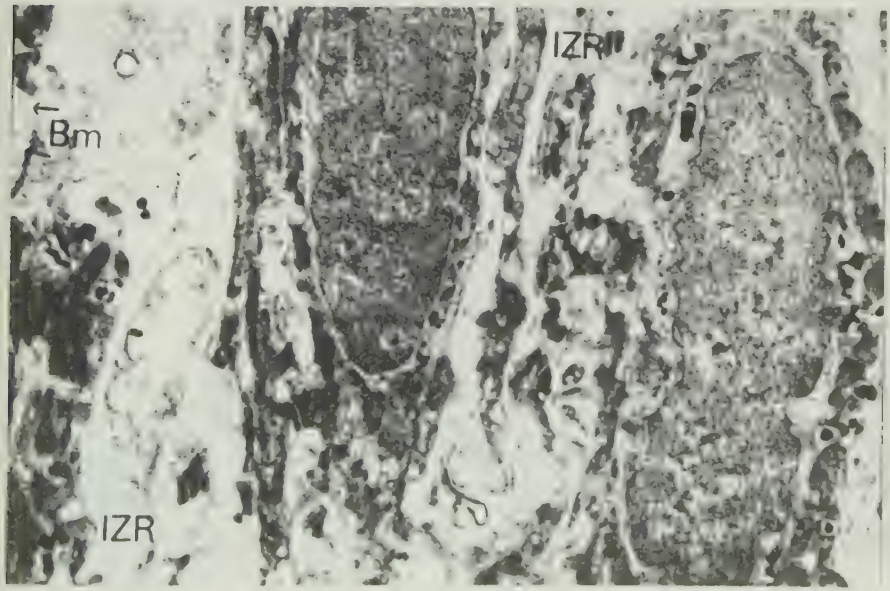
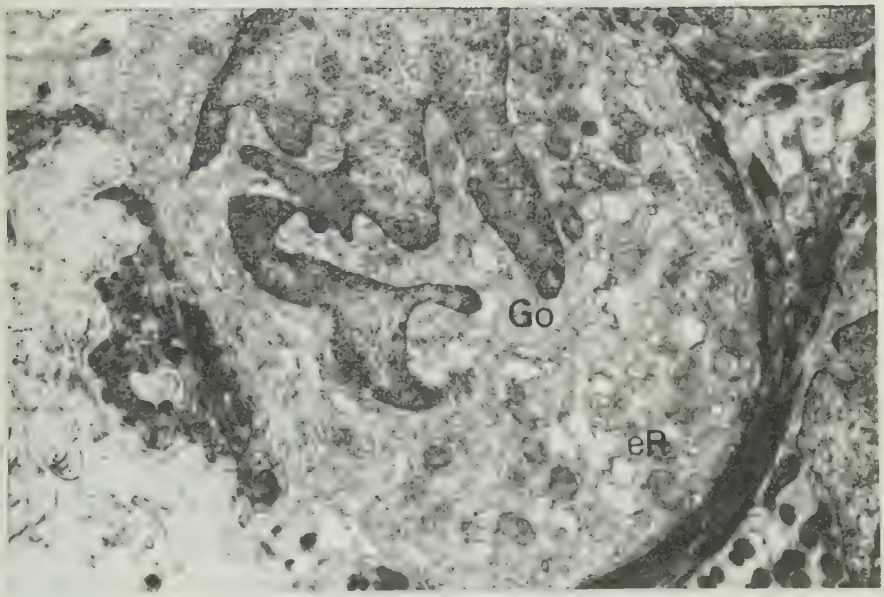

Bm
IZR
IZR

Abb. 16: 3 W/cm^2 20 min

Nichtkeratinozyt mit gelappten Kern und zahlreichen Vakuolen im Zytoplasma, geweitetem endoplasmatisches Retikulum (eR) und ausgeprägtem Golgi-Apparat (Go). Vergr. 16 170-fach

Abb. 17: 3 W/cm^2 5 min

Untergehender Nichtkeratinozyt mit Kernpyknose und den Zeichen der Zytolyse im Stratum Malpighi. Vergr. 16 170-fach


Go
eR

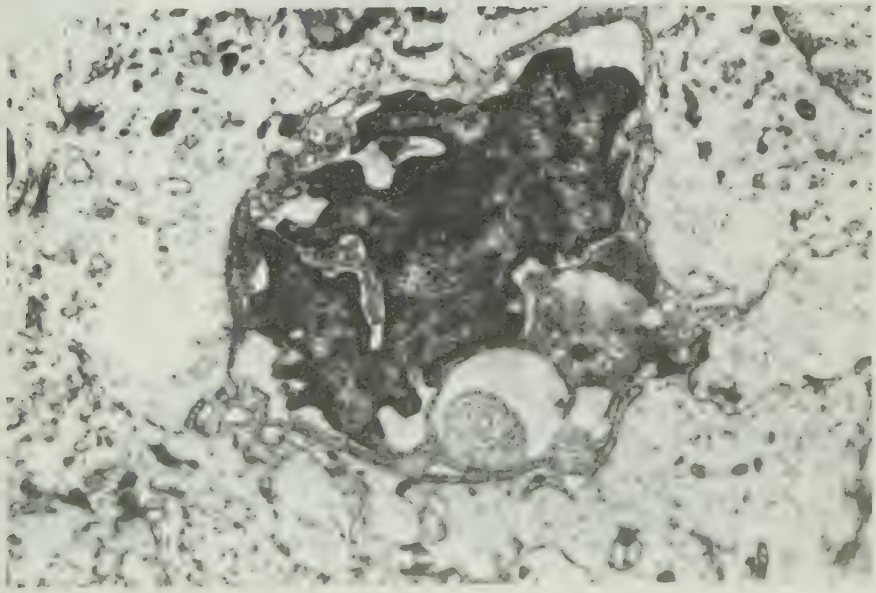
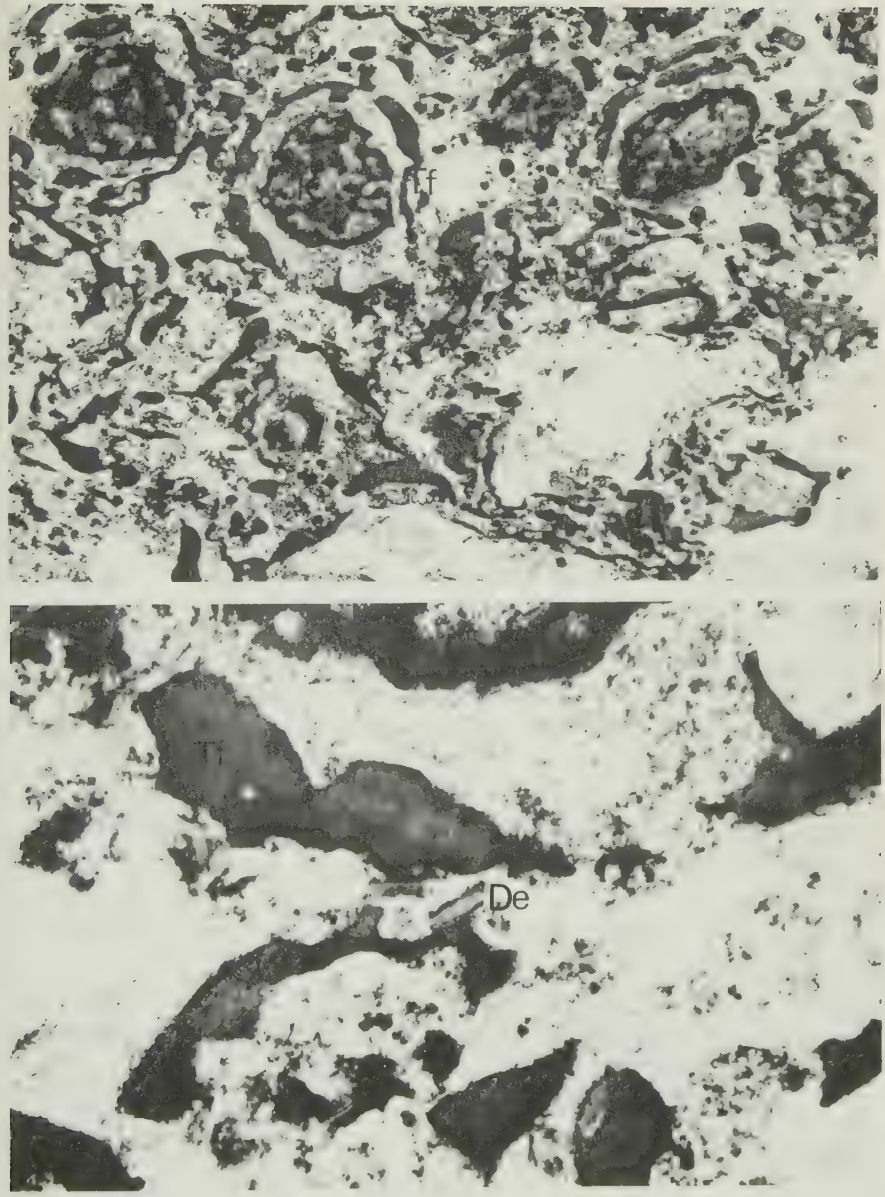


Abb. 18: 3 W/cm^2 30 min ohne Kühlung

Überblick über das Stratum Malpighi. Zerstörter Zellverband, die Tonofilamente (Tf) umrahmen kranzartig die Kerne (K).
Vergr. 6 650-fach

Abb. 19: 3 W/cm^2 30 min ohne Kühlung

Tonofilamentklumpen (Tf), die durch gut differenzierbare Desmosomen (De) zusammengehalten werden.
Vergr. 16 170-fach


Tf
Tf
De

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERGMANN, L.:
Der Ultraschall und seine Anwendung in Wissenschaft und Technik.
S. Hirzel Verlag Stgt., 909 - 960 (1954)

2. BRAUN-FALCO, O.:
Die Dynamik der Hautreaktion nach Hornschichtabriß.
Arch. Dermatol. Forsch. 241, 329 (1971)

3. BREATHNACH, A.S.:
Aspects of Epidermal Ultrastructure.
J. Invest. Derm. 65/1, 2 - 15 (1975)

4. BRIGGAMAN, R.A., C.E. WHEELER:
The Epidermal-Dermal Junction.
J. Invest. Derm. 65/1, 71 - 84 (1975)

5. BRODY, I.:
An electron-microscopic study of the junctional and regular desmosomes in normal human epidermis.
Acta Derm. Venereol. Stockholm 48, 290 - 302 (1968)

6. BRONSKAYA, L.M., I.YE. EL'PINER:
Effect of cations and excess static pressure on the destruction of the cells and cell organelles due to ultrasonic radiation.
Biophysics New York Vol. 15, 777 - 780 (1970)

7. CARSON, P.L., W.W. WENZEL, P. AVERY, W.R. HENDEE:
Ultrasound imaging as an aid to cancer therapy..
Int. J. Radiat. oncol. Biol. Phys. 1, 335 - 343 (1976)

8. CARSON, T.E., S. FISHMAN:
Biological Effects of Ultrasound: skin and cutanous Blood Vessels.
Proc. west. Pharm. Soc. 19, 36 - 39 (1976)

9. CHAPMAN, I.V.:
The effect of ultrasound on the potassium content of rat thymocytes in vitro.
Brit. J. Radiol. 47, 411 - 415 (1974)

10. CHIRKINA, I.A.:
A Reaction of unimpaired skin on ultrasound influence.
ZDRAVOOKHR. BELORUSS 19/9, 22 - 25 (1973)

11. CLARKE, P.R., C.R. HILL:
Biological action of ultrasound in relation to the cell cycle.
Exptl. Cell. Res. New York 58, 443 - 444 (1969)

12. DAKUBU, S.:
Cell inactivation by ultrasound.
Biotechnology and Bioengineering New York 18, 465 - 471 (1976)

13. EHLER, R., H. LUTZ, R. PETZOLDT:
Ultraschalldiagnostik - Anwendungsbereiche in der Klinischen Medizin.
Dtsch. Ärzteblatt 4, 215 - 222 (1977)

14. EL'PINER, I.YE., L.M. BRONSKAYA:
Effect of ultrasound on ATPases of the plasma membrane.
Biophysics New York 15, 885 - 889 (1970)

15. FANUCCHI, F., L. BUSSI:
Biologische Wirkungen u. therapeutische Anwendungen des Ultraschall. In:"Der Ultraschall in der Medizin", Kongreßbericht Bd. I, 125 - 130 (1949) Hirzel Verlag Zürich

16. FINDLAY, G.H., N.v.d.W. LIEBENBERG:
The ultrastructure of the epidermis following ultracentrifugation.
Brit. J. Derm. 95, 507 - 512 (1976)

17. FISCHER, P., E. GOLOB, A. KRATOCHWIL, E. KUNZE-MÜHL:
Chromosomenuntersuchung nach Ultraschalleinwirkung.
Wien. Klin. Wschr. 79, 436 - 437 (1967)

18. FUKUYAMA, K., N. INQUE, H. SUZUKI, W.L. EPSTEIN:
Keratinisation.
Int. J. Derm. 15, 473 - 489 (1976)

19. GRIFFIN, J.E.:
Physiological effects of ultrasonic energy as it is used clinically.
Am. Phys. Ther. Assoc. 46, 18 - 26 (1966)

20. HEAPHY, M.R., R.K. WINKELMANN:
The human cutanous basement membrane-anchoring fibril complex: preparation and ultrastructure.
J. Invest. Derm. 68, 177 - 186 (1977)

21. HELLMANN, L., G. DUFFUS, J. DONALD, B. SUNDÉN:
Safety of diagnostic ultrasound in obstretics.
Lancet I, 1133 - 1135 (1970)

22. HILL, C.R., C. ENG:
The possibility of hazard in medical and industrial applications of ultrasound.
Brit. J. Radiol. 41, 561 - 569 (1968)

23. HILL, C.R., G. JOSHI, S. REVELL:
A search for chromosome damage following exposure of chinese hamster to high intensity pulsed ultrasound.
Brit. J. Radiol. 45, 333 - 334 (1972)

24. HUNTER, J.A.A., E. McVITTIE, J.S. COMAISH:
Light and electron microscopic studies of physical injury to the skin. I. Suction, II. Friction.
Brit. J. Derm. 90, 489 - 499 (1974)

25. JANKOWIAK, J.:
Die medizinische Ultraschallforschung in Polen.
Arch. für physikalische Therapie, Balneotherapie und Klimatologie, Leipzig 21, 35 - 39 (1969)

26. KAPKAEV, R.A., K.A. ZUFAROV:
Ultrastructure of the epidermis normally and in eczema.
Vestn. Derm. Vener. 45/6, 23 - 29 (1971)

27. KARDUCK, A., H.G. RICHTER:
Effects of highly dosed ultrasound on the growing rabbit's larynx.
Arch. Oto-Rhino-Laryng. 211, 71 - 80 (1975)

28. KNOCH, H.G., B. HOHAUS, E. KAMENZ:
Über den Einfluß von Ultraschall auf die Wundheilung.
Zentralbl. f. exp. Chir. 5, 268 - 270 (1972)

29. KNOCH, H.G., K. KNAUTH:
Therapie mit Ultraschall.
VEB G. Fischer Verlag Jena, 2. Aufl., 21 - 69 (1977)

30. KOBAYASI, T.:
Anchoring of basal lamina to elastic fibers by elastic fibrils.
J. Invest. Derm. 68/6, 389 - 390 (1977)

31. KOEPPEN, S.:
Die Anwendung des Ultraschalls in der Medizin.
Hippokrates Verlag Stuttgart (1951)

32. KOMURA, J.:
An electron microscopic study of cantharidin-induced acantholysis.
Acta Derm. Kyoto 63, 289 - 294 (1968)

33. KRESSE, H.:
Wirkungen und Nebenwirkungen medizinischen Ultraschalles.
Atomkernenergie 21, 269 - 273 (1973)

34. LEINWEBER, W., W.D. STROHM:
Theoretische Einführung in die Ultraschalluntersuchung.
Therapiewoche 29, 7958 - 7962 (1979)

35. LOCH, E.-G.:
Genetische Gefährdung durch Ultraschalldiagnostik?
Fortschritte der Medizin 91, 59 - 61 (1973)

36. LUPULESCU, A.P., D.J. BIRMINGHAM; H. PINKUS:
An electron microscopic study of human epidermis after acetone and kerosene administration.
J. Invest. Derm. 60/1, 33 - 45 (1973)

37. LUTZ, H.:
Ultraschalldiagnostik (B-Scan) in der Inneren Medizin.
Springer Verlag, 2 - 6 (1978)

38. LYON, M.F., G.M. SIMPSON:
An investigation into the possible hazards of ultrasound.
Brit. J. Radiol. 47, 712 - 722 (1974)

39. MACINTOSH , I.J.C., D.A. DAVEY:
Relationship between intensity of ultrasound and induction of chromosome aberrations.
Brit. J. Radiol. 45, 320 - 327 (1972)

40. MENDEZ, J., B. FRANKLIN. J. KOLLIAS:
Effect of ultrasound on the permeability of D_2O through cellulose membranes.
Biomedicine (Express) 25, 121 - 122 (1976)

41. MIKHAYLOV, I.N.:
Micro- and ultramicroscopical changes of human epidermis during autolysis.
IZV. AKAD. NAUK. SSSR. SER. BIOL. 5, 658 - 663 (1973)

42. MISHIMA, Y., H. PINKUS:
Electron microscopy of keratin layer stripped human epidermis.
J. Invest. Derm. 50, 89 - 102 (1968)

43. NAGAO, S., J.D. STROUD, T. HAMADA, H. PINKUS, D.J. BIRMINGHAM:
The effect of sodium hydroxide and hydrochloric acid on human epidermis - an electron microscopic study.
Acta Dermatovener. Stockholm 52, 11 - 23 (1972)

44. NEUHÄUSER, G.:
Chromosomenveränderungen durch Ultraschall.
Hippokrates, Zschr. f. prakt. Heilkunde, Stuttgart 43/3, 361 - 362 (1972)

45. NIX, T.E.:
Ultraviolet-Induced changes in Epidermis. In: "Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin", Ed. by A.S. Zelickson, Philadelphia, 304 - 319 (1967)

46. ODLAND, G.F., T.H. REED:
Epidermis. In: "Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin", Ed. by A.S. Zelickson, Philadelphia, 54 - 75 (1967)

47. ORFANOS, C.E.:
Feinstrukturelle Morphologie und Histopathologie der verhornenden Epidermis.
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)

48. O'SHEA, J.M., J.H. BRADBURY:
The effect of ultrasonic irradiation on proteins.
Aust. J. biol. Sci. 26, 583 - 590 (1973)

49. PEARSON, R.W.:
Response of Human Epidermis to graded Thermal Stress.
A morphological comparison of burns, cold-induced blisters and pemphigus vulgaris.
Arch. Environ. Health. 11, 498 - 507 (1965)

50. POHLMANN, R., R. RICHTER, E. PAROW:
Über die Ausbreitung und Absorption des Ultraschalls im menschlichen Gewebe und seine therapeutische Wirkung an Ischias und Plexusneuralgie.
Dtsch. med. Wschr. 65, 251 - 254 (1939)

51. PRUNIERAS, M.:
Interactions between the cells of the epidermis.
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 13/8, 743 - 746 (1968)

52. RAKNERUD, N.:
The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless mouse: III Desmosomal transformation during keratinisation.
J. Ultrastruct. Res. 52/1, 32 - 51 (1975)

53. ROTT, H.-D., R. SOLDNER, J. VAN ZYL:
Zur Wirkung von Ultraschall auf menschliche Chromosomen in vitro.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 32, 662 - 665 (1972)

54. RUPEC, M., H. HOFFMEISTER:
Zur Ultrastruktur der Halbdesmosomen.
Dermatologiča (Basel) 138/6, 453 - 458 (1969)

55. SILBERBERG, I.:
Studies by electron microscopy of epidermis after topical application of mercuric chloride.
J. Invest. Derm. 56, 147 (1971)

56. TAKIGAWA, M., S. OFUJI:
Early changes in human epidermis following thermal burns: an electron microscopic study.
Acta Dermatovener. Stockholm 57, 187 - 193 (1977)

57. THACKER, J.:
An approach to the mechanism of killing cells in suspension by ultrasound.
Biochimica et Biophysica Acta 304, 240 - 248 (1973)

58. WATTS, P., A. HALL, J. FLEMING:
Ultrasound and chromosome damage.
Brit. J. Radiol. 45, 335 - 339 (1972)

59. WIDMER, F., P.E. PILET:
Effect of ultrasonic waves on the ribonuclease activity.
Experientia Basel 28, 1165 - 1166 (1972)

60. WINIARSKI, J.:
Experimental studies on the effect of ultrasound on the normal skin of rats.
Przegl. Derm. 60/3, 303 - 307 (1973)

61. WITTENZELLNER, R.:
Tissue-damaging effects of ultrasound.
Ultrasonics 14, 281 - 282 (1976)

62. ZETKIN, SCHALDACH:
Wörterbuch der Medizin. Band I, 6. Aufl., Hrsg. SCHALDACH, H., Thieme Verlag Stuttgart

Herrn Prof. Dr. G. Klingmüller danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine stets freundliche und hilfreiche Unterstützung der Arbeit und für die Übernahme des Referates.

Prof. Dr. med. F. Gullotta sei für die Übernahme des Korreferates gedankt.

Herrn Dr. Stein danke ich für die Anleitung bei der Ultraschall-Beschallung und für die Benutzung seines Ultraschallgerätes.

Frau E. Röser möchte ich für die Einarbeitung in die elektronenoptischen Techniken und ihre Hilfsbereitschaft während der ganzen Arbeit danken.

LEBENSLAUF

1951	13. November geboren als erstes Kind von Johann Dehner und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Krafft, in Würzburg/Bayern.
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Uffenheim.
1962 - 1965	Besuch des Christian-von-Bomhard-Gymnasiums in Uffenheim.
1965 - 1971	Besuch des Humanistischen Zweiges des Friedrich-Alexander-Gymnasiums in Neustadt a.d. Aisch.
1971	Abitur ebenda, Juni
1972	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Maximilians-Universität zu Würzburg.
1973	Vorphysikum in Würzburg.
1974	Physikum in Würzburg.
1975	I. Ärztliche Prüfung in Würzburg.
1975 - 1976	Studium der Humanmedizin an der Karl-Franzens-Universität in Graz/Österreich.
1976	Immatrikulation für Humanmedizin an der Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn.
1977	II. Ärztliche Prüfung in Bonn.
1977 - 1978	Praktisches Jahr an der Universitäts-Augenklinik in Bonn und am Akademischen Lehrkrankenhaus in Lüdenscheid.
1978	25. Oktober III. Ärztliche Prüfung in Bonn und Lüdenscheid.
1978	14. November Approbation als Arzt.
1978	Seit 13. November Assistenzärztin in der Anästhesieabteilung des Akad. Lehrkrankenhauses in Lüdenscheid.